

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Egle-Helene Ervin

**PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitori mõju inimese
embrüonaalsetele tüvirakkudele ja embrüonaalse kartsinoomi rakkudele**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad MSc Valmar Kasuk
prof Toivo Maimets

TARTU 2016

PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitori mõju inimese embrüonaalsetele tüvirakkudele ja embrüonaalse kartsinoomi rakkudele

Nii inimese embrüonaalsetele tüvirakkudele kui ka embrüonaalse kartsinoomi rakkudele on iseloomulik pluripotentsus, mis on saavutatud läbi PI3K/AKT/mTOR signaaliraja aktiveerimise. Kliinilises praktikas on oluline aga indutseerida vastavate rakutüüpide diferentseerumine. Käesolevas töös näidatakse, et madalmolekulaarne ühend, mis takistab PI3K/AKT/mTOR signaalirajasse kuuluva kinaasi, PDPK1, funktsioneerimist, põhjustab pluripotentsuse tagamiseks vajalike valkude taseme languse. Seejuures täheldati, et embrüonaalse kartsinoomi rakkude tundlikkus inhibiitori suhtes varieerub populatsioonisiselt. Lisaks näidati, et embrüonaalse kartsinoomi rakkude pluripotentsus on PI3K/AKT/mTOR signaalirajast rohkem sõltuv kui embrüonaalsete tüvirakkude vastav omadus.

Märksõnad: hES rakud, EC rakud, PI3K/AKT/mTOR signaalirada, PDPK1 inhibiitor
B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

The effect of PDPK1-AKT1 interaction inhibitor on human embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells

Human embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells are undifferentiated cells whose stem cell properties are acquired through PI3K/AKT/mTOR pathway. In clinical practice it is important to regulate this pathway to induce differentiation of both cell types. In this study we show that small molecular inhibitor of PI3K/AKT/mTOR pathway causes remarkable decrease in protein levels which are important for pluripotency. Investigated compound binds to PDPK1, a kinase of previously mentioned pathway, and inhibits its functioning. We also observed that embryonal carcinoma cells' response to inhibitor is bimodal. Furthermore, embryonal carcinoma cells' pluripotency is much more dependent on PI3K/AKT/mTOR pathway than embryonic stem cells'.

Keywords: hES cells, EC cells, PI3K/AKT/mTOR pathway, PDPK1 inhibitor
B200 Cytology, oncology, cancerology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Inimese embrüonaalsed tüvirakud	7
1.2 Kasvaja tüvirakud	8
1.2.1 Inimese embrüonaalse kartsinoomi rakud	9
1.3 AKT	10
1.3.1 AKT-i struktuur	11
1.3.2 AKT-i aktiveerimine ja PI3K/AKT/mTOR signaalirada	12
1.3.3 AKT-i substraadid	13
1.3.4 AKT-i seos kasvajatega	14
1.3.5 AKT-i aktiivsuse inhibeerimine	15
1.3.5.1 PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitor NSC156529	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1 Töö eesmärk	18
2.2 Materjal ja meetodika	18
2.2.1 Rakud ja nende kasvatamine koekultuuris	18
2.2.2 Inhibiitor NSC156529 ja inhibiitoriga töötlus	19
2.2.3 Immunofluoresentsanalüüs	22
2.2.4 Valgusmikroskoopia	22
2.2.5 Läbivoolutsütomeetria	22
2.2.5.1 Läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil kasutatud antikehad	23
2.2.5.2 pAKT-i ja OCT4 taseme määramine läbivoolutsütomeetriliselt	23
2.2.5.3 Läbivoolutsütomeetriga teostatud mõõtmistel saadud andmete analüüs	24
2.3 Tulemused ja arutelu	25
2.3.1 AKT-i ekspressioon hES ja EC rakkudes	25
2.3.2 Inhibiitori kontsentratsiooni optimeerimine rakkude morfoloogia põhjal	25
2.3.3 Inhibiitori mõju hES ja EC rakkudele tavapärase söötmes	26
2.3.4 Insuliini mõju inhibiitori toimele	29
2.3.5 Inhibiitori mõju OCT4 tasemele	32
KOKKUVÕTE	38
SUMMARY	39
TÄNUSÕNAD	41
KASUTATUD KIRJANDUS	42
LISAD	46
Lisa 1	46
Lisa 2	47
Lisa 3	51
LIHTLITSENTS	52

KASUTATUD LÜHENDID

AKT – proteiinkinaas B. Nime saanud viraalse onkogeeni järgi, mis avastati uurides AK hiirt.

ASC – täiskasvanu tüvirakk (ingl *adult stem cell*)

BAD – Bcl-2 seotud apoptoosi promooter (ingl *Bcl-2-associated death promoter*)

BRCA – DNA parandamise eest vastutav tuumorsupressorvalk. Nime saanud inglise keelest tänu seotusele rinnavähiga (ingl *breast cancer*).

BSA – veise seerumi albumiin (ingl *bovine serum albumin*)

CDK2 – tsükliinsõltuv kinaas 2 (ingl *cyclin-dependent kinase 2*)

CSC – kasvaja tüvirakk (ingl *cancer stem cell*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool (ingl *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DMEM – ingl *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EC rakud – embrüonaalse kartsinoomi rakud (ingl *embryonal carcinoma cells*)

ES rakud – embrüonaalsed tüvirakud (ingl *embryonic stem cells*)

FBS – veise loote seerum (ingl *fetal bovine serum*)

FGF – fibroblasti kasvufaktor (ingl *fibroblast growth factor*)

FOXO1 – FOX perekonna valk O1 (ingl *forkhead box protein O1*)

GSK – glükogeeni süntaasi kinaas (ingl *glycogen synthase kinase*)

hES rakud – inimese embrüonaalsed tüvirakud (ingl *human embryonic stem cells*)

ICM – sisemine rakumass (ingl *inner cell mass*)

IGF-1 – insuliinisarnane kasvufaktor 1 (ingl *insulin like growth factor 1*)

MFI – fluoresentsi intensiivsuse mediaanväärtus (ingl *median fluorescence intensity*)

mTOR – rapamütsiini märklaud imetajas (ingl *mammalian target of rapamycin*)

mTORC – valkkompleks, mille üheks komponendiks on mTOR (ingl *mammalian target of rapamycin complex*)

NANOG – transkriptsioonifaktor, mis on nime saanud Iiri mütoloogia Nooruse maa järgi (iiri *Tír na nÓg*)

NGF – närvirakkude kasvufaktor (ingl *neural growth factor*)

NGS – preimmuunse kitse seerum (ingl *normal goat serum*)

OCT4 – oktameeri siduv transkriptsioonifaktor 4 (ingl *octamer-binding transcription factor 4*)

pAKT – fosforüleeritud AKT (ingl *phosphorylated AKT*)

PB – permeabiliseerimispuhver (ingl *permeabilization buffer*)

PBS – fosfaat-puhverdatud soolalahus (ingl *phosphate buffered saline*)

PDPK1 – fosfoinositiid sõltuv proteiinkinaas 1 (ingl *phosphoinositide dependent protein kinase-1*)

PFA – paraformaldehüüd

PH-domään – Pleckstrini homologia domään (ingl *Pleckstrin homology domain*)

PI3K – fosfoinositiid 3-kinaas (ingl *phosphoinositide 3-kinase*)

PIP2 – fosfatidüülinositol-4,5-bisfosfaat (ingl *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*)

PIP3 – fosfatidüülinositol-3,4,5-trisfosfaat (ingl *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*)

PKB – proteiinkinaas B ehk AKT (ingl *protein kinase B*)

PTEN – valk, mis funktsioneerib fosfataasina ning omab valgule Tensin sarnast domääni (ingl *Phosphatase and Tensin Homologue*)

ROCK – Rho sõltuv proteiinkinaas (ingl *Rho-associated protein kinase*)

RTK – retseptor türosiin kinaas (ingl *receptor tyrosine kinase*)

S6K – ribosoomi valgu S6 kinaas (ingl *ribosomal protein S6 kinase*)

SISSEJUHATUS

Tüvirakud on hulkraksetes organismides leiduvad diferentseerumis- ning jagunemisvõimelised rakud. Need on vajalikud organismi arenguks ning täiskasvanu kudede uuendamiseks. Teadlaste huvi tüvirakkude vastu on seotud nii nende kasutamisega regeneratiivses meditsiinis kui ka osalemisega kasvajate kujunemisel ja taastekkel.

Inimese embrüonaalsed tüvirakud on varases embrüonaalses arengus esinevad pluripotentsed rakud, mis on eellaseks kõikidele loote rakkudele. Tänu võimele piiramatult jaguneda ning diferentseeruda igaks organismis leiduvaks rakutüübiks on inimese embrüonaalseid tüvirakke võimalik kasutada koekahjustuste parandamisel. Embrüonaalse kartsinoomi rakud on aga kasvaja tüvirakud, mida nimetatakse sageli inimese embrüonaalsete tüvirakkude halvaloomulisteks vasteteks. Sarnaselt embrüonaalsetele tüvirakkudele omavad need eneseuuendamisvõimet ja märkimisväärset arengupotentsiaali. Oluline erinevus on aga kuulumine halvaloomuliste kasvajate koosseisu. Lisaks sellele, et embrüonaalse kartsinoomi rakud on vajalikud kasvaja kujunemiseks ja säilimiseks, on need seotud ka kasvajate taastekkega. Kui vähi tüvirakud jäävad alles peale ravimite ja/või teraapiate kasutamist, on need võimelised taasmoodustama tervikliku kasvaja.

Inimese embrüonaalsed tüvirakud ja embrüonaalse kartsinoomi rakud sarnanevad mitmete omaduste (sh geeniekspressiooni profiili) poolest. On näidatud, et vastavad rakud kasutavad samasid signaaliradasid tagamaks tüvirakulisi omadusi. Üheks oluliseks võrgustikuks on PI3K/AKT/mTOR signaalirada, mis reguleerib rakkude metabolismi, jagunemist ning diferentseerumist. Selle signaaliraja inhibeerimine võiks kaasa tuua rakkude arengupotentsiaali vähenemise, mis on vajalik kasvajavastases võitluses ning rakuteraapias.

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse osas antakse ülevaade töös kasutatavatest rakutüüpidest ning rakuliste protsesside reguleerimisel osalevast kinaasist AKT. Eksperimentaalselt eesmärgiks oli uurida PI3K/AKT/mTOR signaalirada inhibeeriva madalmolekulaarse ühendi mõju inimese embrüonaalsetele tüvirakkudele ja embrüonaalse kartsinoomi rakkudele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Inimese embrüonaalsed tüvirakud

Organismi areng saab alguse viljastatud munarakust, millest lõigustumise ja esimese diferentseerumise tulemusel moodustub blastotsüst. Blastotsüst koosneb sisemisest rakumassist (ICM, ingl *inner cell mass*) ja seda ümbritsevast välimisest rakkude kihist ehk trofoblastist. Trofoblast on eellaseks lootevälistele kudedele (nt platsentale), mis toetavad embrüo arengut. ICM on aluseks aga kõikidele loote rakkudele. Blastotsüsti ICM-ist rakkude eraldamisel saadakse embrüonaalsed tüvirakud (hES rakud, ingl *human embryonic stem cells*), mis on samuti võimelised diferentseeruma kõikideks organismi rakutüüpideks. Sellist rakkude omadust nimetatakse pluripotentsuseks.

ICM-ist eraldatud hES rakkude pluripotentsusele viitab klassikaliste arengupotentsiaali defineerivate markerite, OCT4, NANOG, aluseline fosfataas ja telomeraas, ekspressioon (Thomson *et al.*, 1998). hES rakkude kultiveerimisel on oluline pluripotentsuse säilitamine, et tagada nende jagunemisvõime. Seejuures on vastavate rakkude omapäraks vajadus spetsiifilise kasvupinna järele. Kui esmalt hES rakud eraldati, siis kasutati nende kultiveerimisel toiterakkudena hiire embrüonaalseid fibroblaste, mis aitasid tüvirakkudel säilitada diferentseerumata oleku (Thomson *et al.*, 1998). Tänapäeval koosneb üks enim kasutatavaid kasvusüsteeme Matrigeliga kaetud pindadest ja defineeritud koostisega söötmest (Desai *et al.*, 2015). Matrigel on hiire sarkoomi rakkude produtseeritud ekstratsellulaarse maatriksi komponentide segu, mis aitab hES rakkudel säilitada pluripotentset fenotüüpi (Mallon *et al.*, 2006). Suboptimaalsetel tingimustel (nt toiterakkude puudumisel või rakkude kuhjumisel) on täheldatud spontaanset diferentseerumist (Thomson *et al.*, 1998). Regeneratiivses meditsiinis kasutamiseks on oluline aga hES rakkude suunatud diferentseerumine ning homogeense ja geneetiliselt stabiilse rakupopulatsiooni saavutamine (Vazin ja Freed, 2010). Soovitavate omadustega rakkude saamiseks on vajalik nende kultiveerimine spetsiifiliste faktorite juuresolekul või mõjutamine erinevate meetoditega. Näiteks on võimalik mõjutada hES rakkude arengupotentsiaali reguleerides ekstratsellulaarsete faktoritega PI3K/AKT signaalirada, mis on oluline eneseuuendamisvõime säilitamisel (Chen *et al.*, 2012). Seeläbi on võimalik indutseerida hES rakkude diferentseerumist erinevateks organismi rakutüüpideks, mis on vajalikud koekahjustuste parandamisel.

1.2 Kasvaja tüvirakud

Lisaks healoomulistele protsessidele on tüvirakkudel oluline roll ka kasvajates. Kasvajad on rakkude kontrollimatul jagunemisel tekkinud heterogeensed moodustised, mis koosnevad nii diferentseerunud kui ka diferentseerumata rakkudest. Kasvaja tüvirakkude teooria kohaselt leidub kasvajates väike alamrühm rakke, millel on piiramatult jagunemisvõime. Neid rakke nimetatakse kasvaja tüvirakkudeks (CSC, ingl *cancer stem cell*). CSC-d on aluseks kõikidele kasvajas leiduvatele rakutüüpidele ning seetõttu olulised kasvaja arengul, säilimisel, metastaseerumisel ja taastekkimisel (Silván *et al.*, 2011).

CSC-d on eksperimentaalselt kirjeldatud läbi nende võime taastekitada kasvajat, kui kasvajast pärit rakud transplanteerida immundefitsiitsesse hiirde (Silván *et al.*, 2011). 1937. aastal näitasid Furth ja Kahn, et leukeemia ehk vere- ja lüüdivähist pärit rakkude viimine hiirde põhjustab leukeemiat inokuleeritud hiires (Furth ja Kahn, 1937). Mitmete märkimisväärsetele avastustele järgnes CSC-de isoleerimine inimese akuutsest müeloidsest leukeemiast 1994. aastal (Silván *et al.*, 2011). Sellest ajast alates on näidatud CSC-de olemasolu mitmetes kasvajates ja märgatud nende resistentsust kasvajakasvatuse teraapia suhtes. Vastupidavus erinevatele ravimeetoditele on tingitud toksiliste molekulide välja pumpamisest rakust ja muutustest rakkude ellujäämist tagavate signaaliradade regulatsioonis. Lisaks on tüvirakkude vähenenud tundlikkus vähiteraapia suhtes seletatav neid ümbritseva mikrokeskkonnaga, mis sisaldab kasvajakasvatuse toetavaid signaalmolekule (Tsai *et al.*, 2014). Valdavalt ongi vähiravi ebaõnnestumine tingitud CSC-de säilimisest, mis põhjustab kasvaja taastekke. Seega on kasvajakasvatuse teraapia edukuseks tingimata vajalik CSC-de hävitamine (Chen *et al.*, 2013).

CSC-de elulemise mõjutamiseks on oluline mõista nende päritolu. Arvatakse, et enamus kasvajaid saab alguse üksikust rakust, milles on toimunud geneetilised ja/või epigeneetilised muutused. Selleks üheks rakuks võib olla koespetsiifiline tüvirakk, mis on olemas normaalses koes, kuid võib muutuda modifikatsioonide tulemusel tumorigeenseks. Seda hüpoteesi toetab fakt, et tüvirakkudel on pikk eluiga, mis võimaldab mutatsioonide kuhjumist. Lisaks on CSC-del mitmeid täiskasvanu tüvirakkudele (ASC, ingl *adult stem cells*) iseloomulikke tunnuseid (näiteks eneseuundamis- ja diferentseerumisvõime). ASC-de muutumist tumorigeenseks kutsutakse teatud juhtudel esile tüvirakke ümbritseva keskkonna muutus. ASC-d on ümbritsetud tavaliste somaatiliste rakkudega, mis on vajalikud tüvirakkude identiteedi säilitamiseks. Muutused ümbritsevas rakkudes käivitavad normaalsete ASC-de transformeerumise halvaloomulisteks kasvajakasvatusteks (Silván *et al.*, 2011). Kõikide kasvajate tüvirakkude aluseks ei ole siiski tüvirakud. CSC-d võivad pärineda ka tavalistest somaatilistest rakkudest,

mis geneetiliste muutuste tulemusel dediferentseeruvad ja omandavad tüvirakkudele iseloomulikud omadused. 2001. aastal näitasid Schmidt ja Przybylski, et T-lümfoidne leukeemia saab alguse T-rakkudest, mille T-raku retseptori geen on toimunud ümberkorraldused (Silván *et al.*, 2011). 2009. aastal leiti, et rinnavähi diferentseerunud rakud on võimelised dediferentseeruma CSC-deks (Meyer *et al.*, 2009).

Sõltumata sellest, kas CSC-d pärinevad ASC-dest või somaatilistest rakkudest, on need sarnased embrüonaalsetele tüvirakkudele (ES rakud, ingl *embryonic stem cells*). Juba enne kasvaja tüvirakkude avastamist märgati sarnasusi tuumori ja embrüo arengus. Tänapäeval uuritakse CSC-de ja ES rakkude geeniekspressiooni, et mõista, kuidas CSC-d omandavad ES rakkudele iseloomulikud tunnused (Silván *et al.*, 2011). Kuna CSC-d on aluseks kasvaja kujunemisele ja säilimisele, on nende geeniekspressiooni ja signaaliradade mõjutamine potentsiaalne märklaud kasvajate vastases võistluses (Silván *et al.*, 2011).

1.2.1 Inimese embrüonaalse kartsinoomi rakud

Üheks tuumoriks, mille vastases teraapias tuleb arvestada tüvirakkude olemasoluga, on teratokartsinoom. Teratokartsinoom on peamiselt munandites esinev halvaloomuline kasvaja, mis pärineb primordiaalsest iduteerakkudest ehk sugurakkude eellastest (Damjanov, 1993). Teratokartsinoomid koosnevad suurest hulgast somaatilistest ja ekstraembrüonaalsetest rakkudest, mille vahel paiknevad tüvirakkude kogumikud (Kleinsmith ja Barry Pierce, 1964). Antud kogumikke moodustavaid kasvaja tüvirakke nimetatakse embrüonaalse kartsinoomi rakkudeks (EC rakud, ingl *embryonal carcinoma cells*) (Barry Pierce *et al.*, 1960).

EC rakud on teratokartsinoomide jagunemisvõimelised rakud, mis on vajalikud kasvaja säilimiseks ning arenguks (Andrews *et al.*, 2005). Seda tõestasid Kleinsmith ja Pierce, kes näitasid, et üksikute EC rakkude viimisest hiirde piisab, et põhjustada tervikliku kasvaja teket (Kleinsmith ja Barry Pierce, 1964). EC rakkudest saadud diferentseerunud derivaatide jagunemisvõime on vähenenud ehk kartsinoomide prolifererumine ja metastaseerumine on tingitud neis sisalduvatest tüvirakkudest. Seetõttu soovitakse indutseerida EC rakkude spetsialiseerumist, et vähendada kasvaja agressiivsust. EC rakke iseloomustab aga vähenenud diferentseerumisvõime, mistõttu on nende jagunemispotentsiaali piiramine kasvajavastases teraapias raskendatud (Andrews *et al.*, 2005). Diferentseerumist pärsvad muutused, mis on aset leidnud EC rakkude kromosoomistikus. Nimelt iseloomustab paljude EC rakkude karüotüüpi 17. ja 12. kromosoomide piirkondade kordistumine, mis on seotud rakkude eneseuundamisvõime säilimisega (Andrews *et al.*, 2005). Näiteks on 2102Ep rakkudes kordistunud osa 12. kromosoomist, kus paikneb NANOG-i geen (Josephson *et al.*, 2007).

NANOG on transkriptsioonifaktor, mis tagab rakkude pluripotentsuse ning takistab diferentseerumist (Mitsui et al., 2003).

Teratokartsinoomide tüvirakke on nimetatud ka embrüonaalsete tüvirakkude halvaloomulisteks vasteteks (Andrews, 2002; Damjanov, 1993). Mõlematele tüvirakkudele on iseloomulik jagunemis- ja diferentseerumisvõime, kuid EC rakkude nõ valmisolek spetsialiseeruda on võrreldes embrüonaalsete tüvirakkudega tagasihoidlikum. Selliste mitmetes aspektides sarnaste, kuid samas nii erineva iseloomuga rakkude võrdlemine võimaldab uurida rakkude pluripotentsust ning tüvirakkude ja kasvajate omadusi (Andrews *et al.*, 2005). On näidatud, et nii EC kui ka hES rakkudes on märkimisväärsel tasemel ekspresseeritud AKT. Tegemist on kinaasiga, mis on vajalik eneseuundamisvõime ja pluripotentsuse säilitamiseks, olles seeläbi atraktiivseks märklauaks EC ja hES rakkude diferentseerimisel (Lin *et al.*, 2012).

1.3 AKT

AKT ehk proteiinkinaas B (PKB) on seriin- või treoniinkinaas, mis omab olulist rolli mitmetes raku protsessides. Substraate fosforüleerides osaleb AKT glükoosi metabolismi (Brozinick ja Birnbaum, 1998), apoptoosi (Kulik *et al.*, 1997), translatsiooni (Scheid *et al.*, 2005), rakkude jagunemise ja migratsiooni regulatsioonis (Watton ja Downward, 1999).

AKT-i leidub rakus kolme isovormina: AKT1 ehk PKB α , AKT2 ehk PKB β ning AKT3 ehk PKB γ (Song *et al.*, 2005). AKT-i erinevad isovormid on kodeeritud erinevate geenide poolt, mis paiknevad erinevates kromosoomides, kuid sellest olenemata on neil kõigil sarnane struktuur (Fayard *et al.*, 2005). Erinevate isovormide vaheline homoloogia on 80% (Toker ja Marmiroli, 2012; Yang *et al.*, 2004). Olenemata AKT-i isovormide sarnasest struktuurist on erinevatel isovormidel spetsiifiline funktsioon. AKT1 osaleb raku ellujäämise reguleerimises läbi apoptoosi inhibeerimise (Kulik *et al.*, 1997) ning indutseerib valgu tootmist, mis avaldub AKT1 defektsete hiirte väiksemas kasvus (Chen *et al.*, 2001). Apoptoosi inhibeerimise tõttu mängib antud isovorm olulist rolli erinevate kasvajavormide arengul (Kulik *et al.*, 1997). Peale selle on näidatud, et just AKT1 tagab EC rakkude eneseuundamisvõime läbi pluripotentsusfaktor OCT4 fosforüleerimise (Lin *et al.*, 2012). Sarnaselt AKT1-le on ka AKT2 seotud kasvajate kujunemisega. Lisaks sellele on AKT2 oluline komponend insuliini signaalirajas ja seega vajalik glükoosi homöostaasi hoidmiseks (Brozinick ja Birnbaum, 1998). Näiteks fosforüleerib AKT2 glükogeeni süntaasi kinaas-3 (GSK-3), mille tulemusel läbi mitme vaheetapi indutseeritakse glükogeeni süntees rakkudes (Weeren *et al.*, 1998). AKT3 roll on ebaselge, kuid peamiselt on selle ekspressiooni detekteeritud ajus (Gonzalez ja

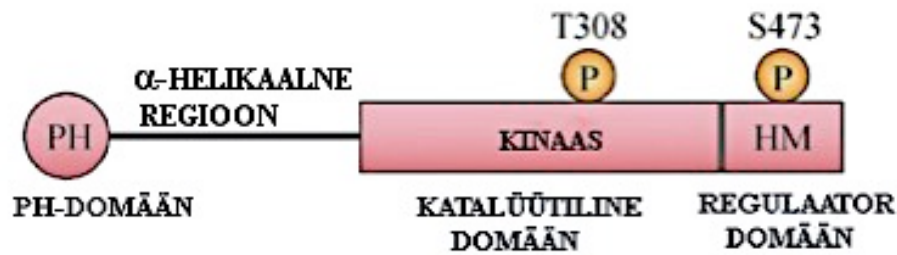
McGraw, 2009a). Lisaks on näidatud, et AKT3 ekspresseerub südames, kopsus, neerus ja skeletilihastes (Romano, 2013).

Varasematest uuringutest ilmneb, et AKT-i isovorme iseloomustab spetsiifiline funktsioon, kuid ei teata, milliste mehhanismide abil see saavutatakse. Seejuures võib erinevate isovormide aktivatsiooni esile kutsuda sama ekstratsellulaarne faktor, kuid tulemuseks on isovormi spetsiifiline vastus. See võib olla tingitud erinevast rakusisesest lokalisatsioonist, interakteerumisest erinevate faktoritega ning isovormile spetsiifiliste substraatide fosforüleerimisest. Näiteks reguleerib insuliin nii AKT1 kui ka AKT2 aktiivsust, kuid plasmamembraanile akumulereerub eelistatult AKT2. Kinnitumine plasmamembraanile on vajalik AKT-i aktiveerimiseks (Gonzalez ja McGraw, 2009b).

1.3.1 AKT-i struktuur

AKT kuulub cAMP-sõltuvate proteiinkinaaside perekonda. Kõik selle perekonna kinaasid omavad homoloogilist struktuuri ja sarnast aktivatsiooni mehhanismi. Sellest lähtuvalt on ka AKT-i isovormid sarnase ülesehitusega: N-terminaalne PH-domään (ingl *pleckstrin homology domain*), keskmine kinaasi domään ja C-terminaalne regulatoorne domään, mis sisaldab hüdrofoobset motiivi (joonis 1)(Song *et al.*, 2005).

PH-domään on oluline valkude seondumisel bioloogiliste membraanidega. See koosneb keskmiselt 120 aminohappest (Hirata *et al.*, 1998) ja on võimeline interakteeruma PIP3-ga (fosfatidüülinositol-3,4,5-trisfosfaat, ingl *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*), mis on seotud raku plasmamembraaniga. PH-domäänist C-terminuse poole jääb katalüütiline domään. Katalüütilise kinaasi domääni ja PH-domääni vaheline intramolekulaarne interaktsioon on vajalik, et säilitada AKT-i inaktiivne olek (Toker ja Marmiroli, 2012). Katalüütilise domääni koosseisus on konserveerunud treoniinijääk, mille fosforüülimine põhjustab AKT-i aktiveerumise. Kinaasi domäänile järgneb C-terminaalne regioon, mis sisaldab hüdrofoobset motiivi F-P-Q-F-S-Y (F-fenüülalaniin, P- proliin, Q- glutamiin, S- seriin, Y- türosiin). Hüdrofoobse domääni seriinijääk peab olema fosforüülitud, et tagada AKT-i täielik aktiivsus (Song *et al.*, 2005). Lisaks jääb PH-domääni ja katalüütilise regiooni vahele lühike α -helikaalne regioon, mille koosseisu kuuluv treoniinijääk fosforüleeritakse kotranslatsiooniliselt. See modifikatsioon stabiliseerib AKT-i struktuuri ja kaitseb degradatsiooni eest (Toker ja Marmiroli, 2012). α -helikaalse regiooni juures on oluline veel seegi, et see on kõige varieeruvam regioon erinevate isovormide vahel ja võib seeläbi olla seotud isovormide spetsiifilise funktsiooniga (Clark ja Toker, 2014).



Joonis 1. AKT1 struktuur. HM – hüdrofoobne motiiv, P – fosfaatrühm, T308 – treoniinijääk positsioonis 308, S473 – seriinijääk positsioonis 473 (muudetud Reneer ja Marti, 2012).

1.3.2 AKT-i aktiveerimine ja PI3K/AKT/mTOR signaalirada

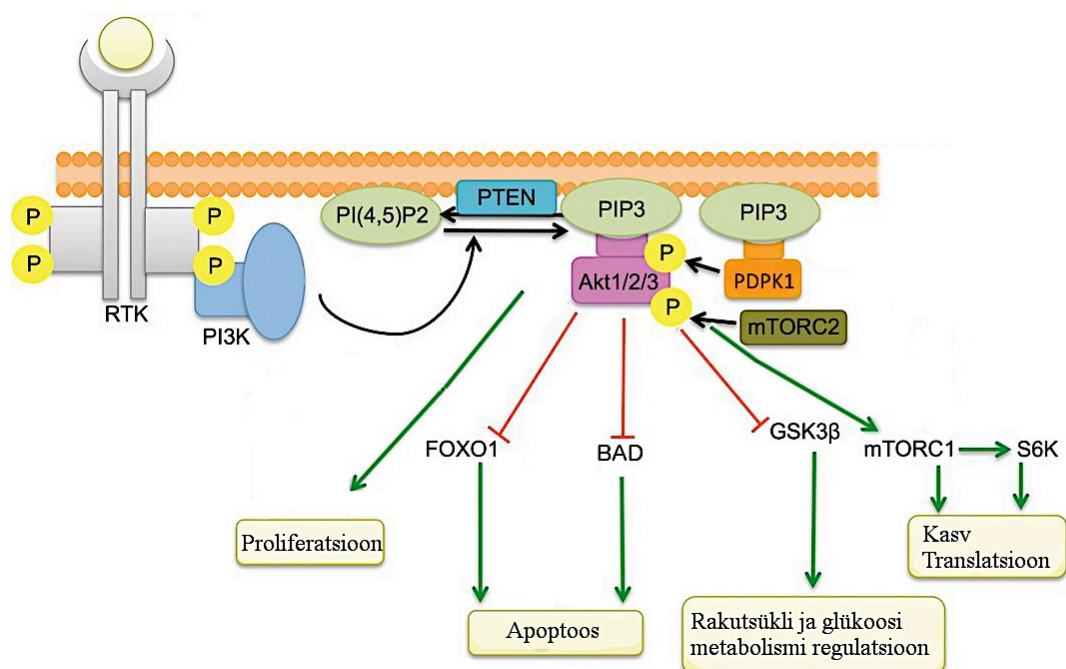
AKT-i erinevad isovormid omavad osaliselt kattuvat mitmeetapilist aktiveerimisrada, mis on võimalik isovormide sarnase struktuuri tõttu (Cheng *et al.*, 2005a; Toker ja Marmiroli, 2012). Kõik AKT-i isovormid lokaliseeruvad inaktiivsena tsütoplasmas ning aktiveeritakse läbi ekstratsellulaarse faktori käivitatud PI3K (fosfoinositiid 3-kinaas, ingl *phosphoinositide 3-kinase*) signaaliraja (Toker ja Marmiroli, 2012).

PI3K signaalirada on keeruline võrgustik, mis algab ligandi (nt kasvufaktori, tsütokiini või hormooni) seondumisega raku plasmamembraanil paikneva ligandile spetsiifilise retseptoriga (joonis 2). Peamiste faktorite alla, mis aktiveerivad PI3K signaalirada, kuuluvad epidermaalne kasvufaktor, insuliin, insuliini sarnane kasvufaktor-1 (IGF-1, ingl *insulin like growth factor 1*) ja närvirakkude kasvufaktor (NGF, ingl *neural growth factor*) (Romano, 2013). Ligandi seondumine retseptorile põhjustab läbi mitme vaheetapi PI3K aktivatsiooni. Aktiivne PI3K fosforüleerib fosfatidüülinositool-4,5-bisfosfaadi (PIP2), mille tulemusena tekib fosfatidüülinositool-3,4,5-trisfosfaat (PIP3) (Cheaib *et al.*, 2015). PIP3-ga seondub PH-domääni kaudu AKT. Seondumine on vajalik AKT-i translokeerumiseks tsütoplasmast plasmamembraanile (Fayard *et al.*, 2005) ning AKT-i konformatsiooni muutumiseks. Konformatsiooni muutuse tulemusel on ligipäasetavad AKT-i aktiveerimiseks vajalikud reguleatoorsed järjestused (Andjelković *et al.*, 1999).

Plasmamembraanile kinnitunult toimub mitmest etapist koosnev AKT-i aktiveerimine. Lisaks AKT-ile seondub PIP3 abil plasmamembraanile fosfoinositiid sõltuv proteiinkinaas 1 (PDK1, tuntud ka kui PDK1, ingl *phosphoinositide dependent protein kinase-1*) (Fayard *et al.*, 2005), mis fosforüleerib AKT-i katalüütilise domääni treoniinijäägi. AKT-i täielikuks aktiveerimiseks on vajalik ka seriinijäägi fosforüülimine C-terminaalse hüdrofoobse motiivi koosseisus (Cheng *et al.*, 2005a), kuid selle mehhanism ei ole täielikult selge (Fayard *et al.*,

2005). On pakutud mitmeid kandidaatkinaase (näiteks mTORC2, ingl *mammalian target of rapamycin complex 2*), kuid tundub, et vastavad ensüümid on rakutüüpidele spetsiifilised ja universaalset kinaasi ei ole leitud (Toker ja Marmiroli, 2012). Seriinijäägi fosforüülimine stabiliseerib AKT-i aktiivse konformatsiooni (Yang *et al.*, 2004).

Peale treoniini- ja seriinijäägi fosforüülimist vabaneb AKT tsütoplasmasse või translokeerub tuuma (Andjelković *et al.*, 1999). Katsed on näidanud, et AKT interakteerub PH-domääni kaudu tsütoskeleti koosseisu kuuluva aktiiniga, mis võimaldab AKT-i rakusisest transporti. Ka tsütoplasmas säilitab AKT katalüütiliselt aktiivse konformatsiooni ning võib rakusiseselt liikuda oma substraatide juurde (Toker ja Marmiroli, 2012).



Joonis 2. PI3K/AKT/mTOR signaalirada. P – fosfaatrühm, PDK1 ehk PDPK1, RTK – retseptor türosiinkinaas. Ligandi seondumine retseptor türosiinkinaasile toob kaasa PI3K aktivatsiooni, mis viib PIP3 moodustumisele raku plasmamembraanil. PIP3 abil seondub membraanile inaktiivne AKT, mis aktiveeritakse fosfaatrühmade lisamisel seriini- ja treoniinijäägi külge. Aktiivne AKT fosforüleerib substraadid, mille tulemusena vastavad valgud aktiveeritakse või inaktiveeritakse (muudetud Clark ja Toker, 2014).

1.3.3 AKT-i substraadid

Erinevate meetoditega on tuvastatud AKT-il üle 200 substraadi, mis omavad konsensusjärjestust RxxR_xS/T (R- arginiin, S- seriin, T- treoniin, x- aminohape, S/T-fosforüülimissait). Valdava osa substraatide kohta ei ole aga teada, milline AKT-i isovorm nende fosforüleerimises osaleb (Toker ja Marmiroli, 2012).

AKT-i üheks substraadiks on mTORC1, mis on mitmest erinevast valgust koosnev kompleks (Toker ja Marmiroli, 2012). mTORC1 paikneb inaktiivsena tsütoplasmas ning aktiveeritakse AKT-i poolt. Aktiivne mTORC1 fosforüleerib seriin- või treoniinkinaasi S6K, mis aktiveerib ribosoomide koostisesse kuuluva valgu S6. Selle tulemusena on ribosoomid ja sellest lähtuvalt ka translatsioon aktiivne. Kiirenenud translatsioon võimaldab suuremal hulgal valkude tootmist, mis omakorda annab võimaluse rakkudel tihedamini jaguneda (Huang ja Manning, 2010). See on üks viisidest, kuidas AKT-i üleekspressioon ja –aktiveerimine viib rakkude kiirema jagunemiseni.

Lisaks mTORC1-le on näidatud, et AKT fosforüleerib ja reguleerib mitmeid valke, mis osalevad rakkude apoptoosi, diferentseerumise ja prolifereerumise kontrollis (Fayard *et al.*, 2005). Näiteks fosforüleerib uuritav kinaas BAD valku (ingl *Bcl-2-associated death promoter*), mille tulemusena on BAD funktsioneerimine häiritud ja rakk ei lähe apoptoosi. Lisaks mõjutab AKT järgnevate ensüümide aktiivsust: BRCA1, CDK2 (ingl *cyclin-dependent kinase 2*), FOXO1A jt (Manning ja Cantley, 2007). Nii BRCA1 kui ka CDK2 on olulised rakutsükli regulatsioonis (Deng, 2006; Hwang ja Clurman, 2005), FOXO1A aga glükoosi metabolismi, apoptoosi ja diferentseerumise regulatsioonis (Gross *et al.*, 2009). AKT signaaliraja kaudu reguleeritakse ka NANOG-i ja OCT4 ekspressiooni läbi OCT4 fosforüleerimise, mis näitab käsitletava signaaliraja otsest seost pluripotentsust tagava võrgustikuga (Alva *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2010). Eksperimentaalselt on täheldatud, et AKT-i aktiivsuse inhibeerimine hES rakkudes on vajalik diferentseerumise indutseerimiseks endodermi suunas (McLean *et al.*, 2007).

1.3.4 AKT-i seos kasvajatega

AKT reguleerib rakkude vohamist, kasvu (suurust), liikuvust, glükoosi metabolismi, DNA reparatsioonisüsteemi, genoomi stabiilsust, apoptoosi ja angiogeneesi ehk veresoonte moodustumist (Romano, 2013). Nende protsesside regulatsioonihäired viivad kasvaja tekkeni. Mitmed uuringud on näidanud, et paljudes kasvajatüüpides on AKT üleaktiveeritud ning see on muutnud AKT-i signaaliraja oluliseks kasvajate vastase võitluse märklauaks (Testa ja Tsichlis, 2005).

AKT-i üleaktiveeritus võib olla tingitud *AKT* geenide amplifikatsioonist, üleekspressioonist, muteerumisest ja/või muutustest AKT-i aktiivsust reguleerivates komponentides (Gonzalez ja McGraw, 2009a). Näiteks mutatsioonide tõttu tuumorsupressorite geenides, mille funktsionaalsed produktid takistaksid kasvaja kujunemist. Üheks PI3K/AKT/mTOR rajaga seotud tuumorsupressoriks on PTEN (ingl *Phosphatase and Tensin Homologue*)(Testa ja

Tsichlis, 2005). PTEN on fosfataas (Myers *et al.*, 1997), mis eemaldab fofaatühma PIP3-lt muutes selle PIP2-ks (joonis 2)(Song *et al.*, 2005). PTEN funktsionaalsuse puudumisel on membraanil rohkem PIP3 molekule, mis toob kaasa AKT-i üleaktiveerituse. AKT-i seondumist plasmamembraanile soodustab ka punktmutatsioon *AKT1* geeni 49. positsioonis (Franke, 2008). AKT-i liigset aktiivsust põhjustavad veel teisedki geneetilised või epigeneetilised muutused AKT-i signaaliraja komponentides. Näiteks võib AKT-i pidevat aktiivsust tingida mutatsioon kasvufaktorile reageerivas retseptoris (Hanahan ja Weinberg, 2000).

AKT-i aktiivsus omakorda põhjustab mTORC1 aktiveerimise, mis kutsub esile transkriptsiooni ja translatsiooni (Huang ja Manning, 2010). Transkriptsiooni ja translatsiooni kõrgem tase põhjustab rakukomponentide kiirema sünteesi ja seeläbi kiirema jagunemise ehk rakkude vohamise. Lisaks mõjutab AKT veel otseselt mitmeid substraate, mis on seotud rakkude jagunemise, ellujäämise ja diferentseerumise reguleerimisega (Testa ja Tsichlis, 2005). Näiteks fosforüleerib aktiveeritud AKT1 transkriptsioonifaktorit OCT4, mis seejärel indutseerib pluripotentsusfaktorite OCT4 ja NANOG ekspressiooni. OCT4 fosforüleerimine soodustab ka *AKT* geeni transkriptsiooni, sest fosforüleerimata OCT4 toimib transkriptsiooni repressorina. Selle tulemusena säilitavad kasvaja tüvirakud eneseuuendamisvõime (Lin *et al.*, 2012).

On täheldatud AKT-i isovormide spetsiifilist üleaktiveeritust erinevates kasvajates. Näiteks iseloomustab munasarjavähi juhtumeid kõrge fosforüleeritud AKT2 (pAKT2) tase, kuid rinnavähi korral on detekteeritud kõrge AKT1 tase (Gonzalez ja McGraw, 2009). Teatud kasvajatele on omane ka AKT3 kõrgem aktiivsus, kuid AKT1 ja AKT2 sagedasem deregulatsioon muudab just need isovormid suurema potentsiaaliga märklauadeks vähiteraapias (Cheng *et al.*, 2005b).

1.3.5 AKT-i aktiivsuse inhibeerimine

Alates AKT-i üleaktiveerituse avastamisest kasvajakudedes on toimunud ulatuslikud uuringud leidmaks mehhanisme, mille abil reguleerida AKT-i funktsioneerimist. Praeguseks on katsetatud erinevaid AKT-i inhibiitoreid ja parema tulemuse saavutamiseks kombineeritud neid omavahel või ka keemiaraviga. AKT-i mõju kontrollmiseks on proovitud reguleerida nii AKT-i aktiveerivaid kui AKT-i enda poolt aktiveeritavaid signaaliraja komponente. Otsese märklauana on sihitud ka AKT-i ennast (Raviv, 2013).

Viimastel aastatel on kasutatud mitmeid väikseid molekule AKT-i inhibeerimiseks, kuid

AKT-i isovormide spetsiifilisus toob kaasa mitmesuguseid kõrvalmõjusid, mistõttu kliinilist kasutust need veel leidnud ei ole. Probleeme põhjustab erinevate isovormide vastandlik funktsioon kasvajates, mistõttu kõikide isovormide inhibeerimisega kaasnevad ka ebasoovitavad efektid (Clark ja Toker, 2014). Samal ajal on väikeste molekulide eeliseks võime läbida rakumembraane ja seega ei vaja need rakku sisenemiseks vektorit (Raviv, 2013). Otseselt AKT-i mõjutavate molekulide miinuseks on nende võime mõjutada ka teisi PH-domääni sisaldavaid valke. Seetõttu proovitakse mõjutada signaaliraja komponente, mis on vajalikud AKT-i aktiveerimiseks. Näiteks on võetud sihtmärgiks PDPK1 ja näidatud, et takistades PDPK1 avaldumist antisense-tehnoloogia abil väheneb glioblastoomirakkude proliferatsioonivõime (Flynn *et al.*, 2000). PDPK1 reguleerimise olulisust kinnitab fakt, et vastava kinaasi üleekspressioon põhjustab imetaja epiteelirakkude transformeerumist (Xie *et al.*, 2003).

Erinevate väikeste molekulide mõju uurimisel on leitud PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitor, mis on spetsiifiline ja millel puuduvad märkimisväärsed tsütotoksilised kõrvalmõjud (Maemets-Allas *et al.*, 2015). Tegemist on ühendiga NSC156529, mida kasutatakse antud töö eksperimentaalsas (Lisa 1).

1.3.5.1 PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitor NSC156529

Esimene etapp AKT1 otseses aktiveerimisprotsessis on selle interaktsioon PDPK1-ga, mille tulemusena AKT1 fosforüülitakse T308 saidis. Antud töös kasutatakse molekuli NSC156529, mis takistab PDPK1 interakteerumist AKT1-ga. Molekul seondub PDPK1-ga, inhibeerib seeläbi AKT1 fosforüleerimist ja takistab signaali ülekannet AKT-i substraatidele (Maemets-Allas *et al.*, 2015).

NSC156529 on veel vähe uuritud molekul, mille AKT-i signaalirada inhibeerivad omadused tuvastati väikeste molekulide raamatukogu kasutamisel. Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi Rakubioloogia õppetooli töörühm viis läbi uuringu, kus vaadeldi NCI (ingl *National Cancer Institute*) Diversity Set I komplekti kuuluvate molekulide mõju erinevatele kasvajakudele ning ka healoomulistele rakkudele. Kasutatud raamatukogu sisaldas 2000 molekuli, millest sobivate kandidaatide selekteerimisel eelistati molekule, mis inhibeerisid PDPK1-AKT1 interakteerumist, kuid ei omanud rakkudele märkimisväärset tsütotoksilist efekti. Töös näidati ka inhibiitori spetsiifilist mõju AKT1 isovormile. Nimelt vähendas inhibiitor PDPK1-AKT1 interakteerumist, kuid ei vähendanud märkimisväärselt PDPK1 seondumist AKT2 ja AKT3-ga (Maemets-Allas *et al.*, 2015).

On näidatud, et NSC156529 vähendab eesnäärme- ja neerukasvaja rakkude vohamist *in vitro* ja inhibeerib eesnäärmekasvaja arengut hiirtes. Seega ei vähene NSC156529 toime ainult AKT1 fosforüleeritus, vaid ka AKT-i substraatide aktiivsus, mis mõjutavad rakkude ellujäämist ja vohamist. Seejuures näidati, et NSC156529 mõju kasvajarakkudele on tugevam kui normaalsetele inimese fibroblastidele ja osteoblastidele. Lisaks leiti, et NSC156529 indutseerib eesnäärmekasvaja rakkude diferentseerumist *in vivo* (Maemets-Allas *et al.*, 2015).

Varasemate tulemuste põhjal on NSC156529 efektiivne molekul, mis võiks vähendada fosforüleeritud AKT-i taset ka EC ja hES rakkudes, olles seeläbi potentsiaalne vahend kasvajate vastases- ning tüvirakuteraapias. Antud ühendi mõju EC ja hES rakkude pluripotentsusega seotud faktoritele uuriti esmakordselt käesoleva töö eksperimentaalses osas.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärk

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitori NSC156529 mõju embrüonaalse kartsinoomi (EC) rakuliini 2102Ep rakkudele ja inimese embrüonaalse tüvirakuliini H9 rakkudele (hES rakud). Seejuures taheti välja selgitada, kas uuritava ühendi toime väheneb fosforüleeritud AKT-i (pAKT) tase ning kas pAKT taseme langusega kaasneb muutus pluripotentsusfaktori OCT4 tasemes.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Rakud ja nende kasvatamine koekultuuris

Töös kasutati inimese embrüonaalse kartsinoomi rakuliini 2102Ep (Globalstem, USA). Rakke kasvatati koekultuuri tassidel (kasvupindala 59 cm^2) DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Lonza, Belgia) söötmes, millele oli lisatud veise loote seerumit (FBS, ingl *fetal bovine serum*, lõppkontsentratsioon 10%, Pan Biotech, Saksamaa) ning aminohapete lahust (*MEM Non-Essential-Amino-Acids-solution*, 1:10, ThermoFisher, Ühendkuningriik). Söödet vahetati üldjuhul iga 48 tunni järel, kuid passeerimise järgselt 24 tunni möödudes. Rakke kasvatati 5% CO₂ sisaldusega ning veeauruga küllastatud inkubaatoris, milles temperatuur oli 37°C.

Rakke passeeriti iga 3-4 päeva järel ning 48 tundi enne inhibiitoriga mõjutamist. Enne passeerimist pesti rakke eelnevalt soojendatud 1-kordse PBS puhvriga (ingl *phosphate-buffered saline*, PAA Laboratories, USA), et vältida söötmes oleva seerumi inhibeerivat mõju trüpsiini toimele. Üksikrakususpensiooni saamiseks inkubeeriti rakke 3-4 minutit 0,25% trüpsiin-PBS lahusega (Naxo, Eesti) 37°C juures. Kinnitunud rakkude vabastamiseks kasvupinnalt suspendeeriti rakke 3-4 minuti möödudes 1 ml mahuga mikropipetiga (keskmiselt 5 korda) ning seejärel kanti 1ml trüpsiini koos rakkudega koekultuuritassile (kasvupindalaga 59cm^2). Koekultuuritassile oli eelnevalt lisatud 9 ml söödet. Trüpsiini mõju inhibeeris söötmes sisalduv seerum. Rakkude ühtlasemaks jaotumiseks tehti tassiga inkubaatoris ringjaid liigutusi. Katseks passeerimine oli analoogne rutiinse passeerimisega, kuid 1 ml rakkudega trüpsiini viidi 15 ml mahuga tuubi, kus ees oli 9 ml söödet. Saadud rakususpensioonis olevate rakkude lugemiseks kasutati hemotsütomeetri kambrit. Rakud passeeriti 12-kannulistele (kasvupindalaga $3,8\text{ cm}^2$) plaatidele ning igasse kannu lisati 150 000 rakku. Kannus kasutati söödet mahuga 1 ml.

Uurimaks inhibiitori mõju ka healoomulistele rakkudele kasutati inimese embrüonaalsete

tüvirakkude liini H9 (WA09, XX karüotüüp, WiCell Research Institute, National Stem Cell Bank, USA). hES rakke kasvatati samuti 5% CO₂ sisaldusega ning veeauruga küllastatud inkubaatoris, milles temperatuur oli 37°C. Kasvupinnana kasutati Matrigeliga (BD Biosciences, USA) kaetud 6-kannulisi (kasvupindala 9,6 cm²) koekultuuri plaate. Matrigel on hiire sarkoomi rakkude produtseeritud ekstratsellulaarse maatriksi komponentide segu, mida kasutatakse hES rakkude kasvupinnana, sest hES rakud ei ole võimelised kasvama vahetult koekultuuri plastikul. Rakkude kasvatamiseks kasutati defineeritud koostisega E8 söödet (STEMCELL Technologies, USA), mida vahetati iga 24 tunni järel. Rakke passeeriti kultiveerimisel iga 3–4 päeva järel ning 48 tundi enne inhibiitoriga töötlust üksikrakulisena. Katseks passeerimiseks pesti rakke 0,5mM EDTA-PBS lahusega ning seejärel inkubeeriti rakke 3–4 minutit 0,5mM EDTA-PBS lahusega 37°C juures. Inkubeerimisaja lõppedes eemaldati EDTA-PBS ning lisati E8 söödet. Rakkude eemaldamiseks kasvupinnalt suspendeeriti rakke 1 ml mahuga mikropipetti kasutades (keskmiselt 10 korda). Saadud suspensioon viidi üle 15 ml mahuga tuubi. Maksimaalse arvu rakkude kätte saamiseks pesti kannu veel 1 ml E8 söötmega, mis seejärel lisati tuubis olevatele rakkudele. Rakususpensioonis olevate rakkude lugemiseks kasutati hemotsütomeetri kambrit. Igasse 12-kannulise plaadi kannu (kasvupindalaga 3,8 cm²) lisati 130 000 rakku. Kannud olid eelnevalt kaetud Matrigeliga. Enne 500 µl rakkudega söötme lisamist oli kannudesse viidud rakkude elulemuse ja kinnitumise suurendamiseks 500 µl 10 µM lõppkontsentratsiooniga ROCK inhibiitoriga (Y-27632, Tocris Bioscience, UK) söödet. ROCK inhibiitoriga sööde jäi rakkudele ligikaudu 24 tunniks. Töös kasutatud hES rakkude passaažiarv jäi vahemikku 40–53.

Nii EC kui ka hES rakkude igapäevase kasvatamisega tegeles Tartu Ülikooli rakubioloogia õppetooli laborant.

2.2.2 Inhibiitor NSC156529 ja inhibiitoriga töötlus

Antud töös kasutati PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitorit NSC156529, mis kuulub NCI (ingl *National Cancer Institute*) keemiliste ühendite raamatukokku *Diversity*. Inhibiitor lahustati DMSO lahustis (Sigma-Aldrich, Saksamaa) ja säilitati 10mM alglahusena -20°C juures. Inhibiitoriga inkubeeriti rakke 48 tundi peale passeerimist, mil rakkude konfidentsus oli ligikaudu 80%. Katseid teostati 3 korduses. Inhibiitoriga töötluste läbiviimiseks inkubeeriti rakke nende igapäevasel kultiveerimisel kasutatavas söötmes (E8 või lisakomponentidega DMEM), millele oli lisatud inhibiitorit. Inhibiitori lõppkontsentratsioon söötmes oli vahemikus 2–5 µM. Kontrollproovidenä kasutati rakke, millele lisati DMSO ja söötme lahus (joonis 3). Seejuures arvestati, et DMSO kontsentratsioon

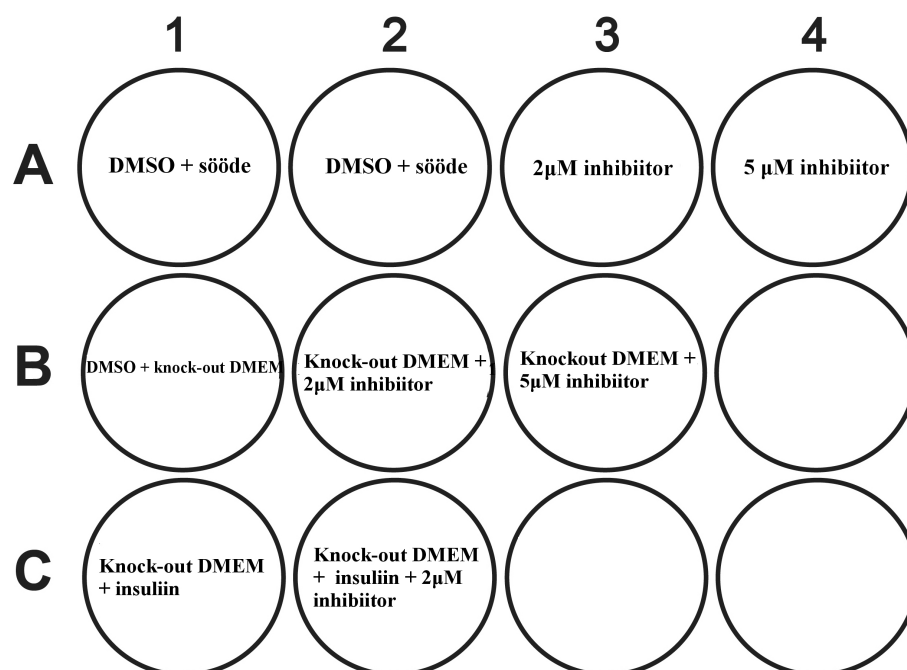
kontrollkannus ja inhibiitoriga kannudes oleks võrdne (0,05%). Erinevate inhibiitori kontsentratsioonidega kannudes DMSO hulga võrdsustamiseks lisati täiendav kogus DMSO-t madalama kontsentratsiooniga kannudesse.

Lisaks kasutati knock-out DMEM söödet (ThermoFisher, USA) ja knock-out DMEM söödet koos insuliiniga (ThermoFisher, USA), et uurida insuliini mõju pAKT-i tasemele ning inhibiitori toimele. Knock-out DMEM on alussööde, mis ei sisalda mitmeid tüvirakkude pikaajaliseks kultiveerimiseks vajalikke faktoreid (sh insuliini) ja mida kasutatakse üldjuhul koos seerumi või seerumi asendajaga (tabel 1). Insuliini toime tuvastamiseks kasutati proove, milles lisati rakkudele ainult knock-out DMEM söödet või knock-out DMEM söödet inhibiitoriga. Samad proovid tehti knock-out DMEM söötmega, millele oli lisatud insuliini mahus, mis on vajalik, et saavutada igapäevasel kultiveerimisel kasutatavale söötmele omane insuliini kontsentratsioon (2 µg/ml) (joonis 3). Rakkude kasvukeskkonnas sisalduvate komponentide muutmist võib vaadelda kui kasvajakoes esineva mikrokeskkonna mõjutamist. Kasvaja mikrokeskkonna alla kuuluvad kasvajakoes olevad veresooned, ekstratsellulaarne maatriks, mitmesugused rakud ja nende poolt sekreteeritavad kasvufaktorid (Mbeunkui ja Johann, 2009).

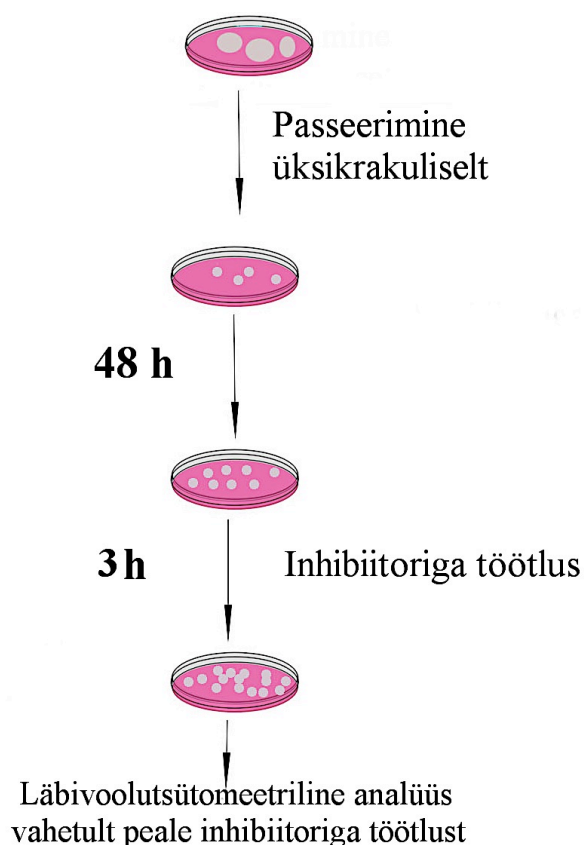
Inhibiitoriga inkubeeriti rakke 3 tundi 5% CO₂ sisaldusega ja veeauruga küllastatud inkubaatoris, kus temperatuuri hoiti 37 °C juures (joonis 4).

	DMEM + lisandid	E8	Knock-out DMEM
Alussööde	DMEM	DMEM/F12	Knock-out DMEM
NaHCO₃	+	+	+
L-askorbiinhape		+	
Seleen	+	+	
Transferriin	+	+	
Insuliin	+	+	
FGF2	+	+	
TGF-β	+	+	

Tabel 1. Töös kasutatavate söötmete komponentide võrdlus. Knock-out DMEM söötmes ei sisaldu mitmed rakkude pikaajaliseks kultiveerimiseks vajalikud faktorid. EC rakkude kasvatamiseks kasutatavasse DMEM söötmesse on lisatud veel aminohapete lahus ja FBS, mis antud tabelis ei kajastu.



Joonis 3. Proovide skeem 12-kannulisel koekultuuriplaadil. Proovides A1-A4 kasutati hES rakkude korral E8 söödet ning EC rakkude korral lisakomponentidega DMEM söödet.



Joonis 4. Katseskeem uurimaks inhibiitori mõju pAKT-i ja OCT4 tasemele. 48 tundi peale passeerimist lisati inhibiitoriga või inhibiitorita sööde, mis jäi rakkudele 3 tunniks. 3 tunni möödudes alustati rakkude ettevalmistamisega läbivoolutsütomeetriliseks analüüsiks.

2.2.3 Immunofluoresentsanalüüs

Immunotsütokeemia on uurimismeetod, mis seisneb rakukomponentide nähtavaks muutmisel antikehaga konjugeeritud fluorestseeruva märgise abil. Rakkude värvimisele järgneb vaatlus fluoresentsmikroskoobiga. Käesolevas töös kasutati immunofluoresentsmikroskoopiat AKT-i erinevate isovormide ekspressiooni tuvastamiseks hES ja EC rakkudes.

Immunofluoresentsanalüüsiks pesti rakke esmalt 1-kordse PBS-iga ning seejärel fikseeriti 4% paraformaldehüüdiga (PFA) 10 minutit. Peale fikseerimist permeabiliseeriti rakud 0,1% Triton X100 (AppliChem, Saksamaa) lahusega 10 minutit ning blokeeriti 4% NGS-ga (preimmuunse kitse seerum, ingl *normal goat serum*, Lab AS, Eesti) 45 minutit. Seejärel inkubeeriti rakke üleöö primaarsete antikehadega ning 60 minutit sekundaarsete antikehadega. Primaarsete antikehadena kasutati pAKT-i vastast küüliku antikeha C31E5E (lahjendusega 1:800, Cell Signaling, USA), AKT1 vastast hiire antikeha 2H10, AKT2 vastast hiire antikeha MAB2315 ja AKT3 vastast hiire antikeha MAB14631 (kõik lahjendusega 1:100, Cell Signaling, USA). Sekundaarsete antikehadena kasutati pAKT-i korral küüliku immunoglobuliinide vastast kana polükloonaalset antikeha, mis oli märgistatud Alexa Fluor 488-ga (lahjendusega 1:200, A21441, ThermoFisher, USA) ning AKT1, AKT2 ja AKT3 korral hiire immunoglobuliinide vastast kitse polükloonaalset antikeha, mis oli märgistatud Alexa Fluor 647-ga (lahjendusega 1:200, A21237, ThermoFisher, USA). Tuumade visualiseerimiseks kanti viimaks rakkudele DAPI (Sigma-Aldrich, Iisrael) lahus lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Kõikide tööstuste vahel pesti rakke 3 korda PBS-iga (va peale blokeerimist, kui pesti ühe korra). Preparaatide valmistamiseks sulundati kattedklaasid sulundusvedelikuga FluorSave Reagent (Merck, Saksamaa) alusklaasile. Preparaate vaadati fluoresentsmikroskoobiga IX81 (Olympus Corporation, Jaapan). Piltide analüüsil ja töötlemisel kasutati programmi Imaris 7.6.5 (Bitplane, Šveits).

2.2.4 Valgusmikroskoopia

Inhibiitori mõju esmaseks visuaalseks hindamiseks vaadeldi rakke 2 tunni 45 minuti möödudes valgusmikroskoobiga Nikon Eclipse TS100. Rakke pildistati Nikon DS-Fi2 kaamera 20x objektiiviga (Nikon Corporation, Jaapan). Vaatluseks valiti aeg lähtuvalt eesmärgist inkubeerida rakke inhibiitoriga täpselt 3 tundi.

2.2.5 Läbivoolutsütomeetria

Läbivoolutsütomeetria on laseritel baseeruv biofüüsikaline tehnoloogia, mida kasutatakse rakkude lugemisel, sorteerimisel ning biomarkerite ekspressiooni detekteerimisel. Uuritavad rakud juhitakse peene joana läbi laserkiire selliselt, et korraga analüüsitakse ühte rakku.

Fluorestseeruvate antikehadega märgistatud rakud emiteerivad laseriga ergastamise tulemusel valgust, mille intensiivsust detekteeritakse. Selles seisneb ka läbivoolutsütomeetrite eelis fluorentsismikroskoobi ees, sest mikroskoobis on võimalik vaid emissioonvalgust vaadata, mitte seda kvantitatiivselt mõõta. Läbivoolutsütomeeter võimaldab mõõta ka väga väikeseid erinevusi ja on seetõttu oluline rakubioloogide tööriist.

2.2.5.1 Läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil kasutatud antikehad

Primaarse antikehana kasutati fosforüleeritud AKT-i (pAKT, treoniin 308) vastast küüliku IgG tüüpi antikeha C31E5E (lahjendusega 1:200, Cell Signaling, USA). Primaarse antikeha isotüübi kontrollina kasutati küüliku IgG tüüpi antikeha ab27478 (lahjendusega 1:138, Abcam, Ühendkuningriik). Sekundaarse antikehana kasutati küüliku immunoglobuliinide vastast kana polükloonaalset antikeha, mis oli märgistatud Alexa Fluor 488-ga (lahjendusega 1:200, A21441, ThermoFisher, USA). Lisaks kasutati ühes korduses primaarset OCT4 vastast hiire monokloonaalset antikeha sc-5279 (lahjendusega 1:20, Santa Cruz Biotechnology, USA). Sekundaarse antikehana kasutati hiire immunoglobuliinide vastast kitse polükloonaalset antikeha, mis oli märgistatud Alexa Fluor 647-ga (lahjendusega 1:200, A21237, ThermoFisher, USA). Lahjenduste tegemiseks kasutati 1-kordset PB (permeabiliseerimispuhver, ingl *permeabilization buffer*) lahust destilleeritud vees.

2.2.5.2 pAKT-i ja OCT4 taseme määramine läbivoolutsütomeetriliselt

Peale 3-tunnist inhibiitoriga töötlust viidi rakud toatemperatuurile ning aspireeriti sööde. Seejärel pesti rakke eelnevalt 37°C juures soojendatud 1-kordse PBS lahusega ning inkubeeriti 0,5% trüpsiin-PBS lahuses 2 minutit. Kahe minuti möödudes lisati 37°C juures soojendatud 2% FBS-i (veise loote seerum, ingl *fetal bovine serum*, Pan Biotech) lahust PBS-is peatamaks trüpsiini mõju. Üksikrakususpensiooni saamiseks suspendeeriti rakke 1ml mikropipetti kasutades (keskmiselt 5 korda) ning viidi seejärel 15 ml mahuga tuubi. Trüpsiini eemaldamiseks tsentrifuugiti rakke toatemperatuuril 200g juures 5 minutit (tsentrifuug 4K15C, Sigma, Saksamaa). Rakud resuspendeeriti eelnevalt soojendatud PBS-is ja tsentrifuugimist korrati. Rakkude fikseerimiseks inkubeeriti neid 10 minutit 1,6% paraformaldehüüdi (PFA) lahuses. Pesemiseks lisati raku suspensioonile 10 minuti möödudes permeabiliseerimispuhvri (PB, ingl *permeabilization buffer*, eBioscience, USA) lahust. Töös kasutati PB 10-kordset lahjendust destilleeritud vees. Peale PB lisamist rakke tsentrifuugiti 200g juures 5 minutit, resuspendeeriti PB-s ja kanti üle eelnevalt 2,5% veise seerumi albumiini (BSA, ingl *bovine serum albumin*, Capricorn Scientific, Saksamaa) lahuse abil kaetud läbivoolutsütomeetri tuubidesse. BSA-ga töötlus toimus 4°C juures 2 tundi ja on

vajalik, et vähendada rakkude kleepumist tuubi seintele. Järgnevalt tsentrifuugiti rakke 300g juures 3 minutit ja resuspendeeriti 2% NGS-PB lahuses. Rakke inkubeeriti 2% NGS-is 30 minutit, et blokeerida antikehade ebaspetsiifilist seondumist. Peale blokeerimist lisati rakkudele primaarsete antikehade lahust PB-s või vastava isotüübikontrolli lahust. Primaarsete antikehadega inkubeeriti rakke 4°C juures üleöö. Järgnevalt pesti rakke PB-ga ja inkubeeriti sekundaarsete antikehadega 60 minutit toatemperatuuril pimedas. Peale inkubeerimist pesti rakke kaks korda PB-ga. Seejärel resuspendeeriti rakusade läbivoolutsütomeetri puhvris ja kanti üle 1,5 ml mahuga tsentrifuugituubidesse. Läbivoolutsütomeetri puhver sisaldas 1-kordset PB-d, 5% FBS-i ja 2mM EDTA-d ning oli enne rakkudele lisamist filtreeritud läbi 20 µm poori läbimõõduga filtri. Enne läbivoolutsütomeetril analüüsimist lisati rakkudele DAPI (Sigma) lahust PB-s lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Proove inkubeeriti 10 minutit ja seejärel analüüsiti läbivoolutsütomeetriga FACSAria I.

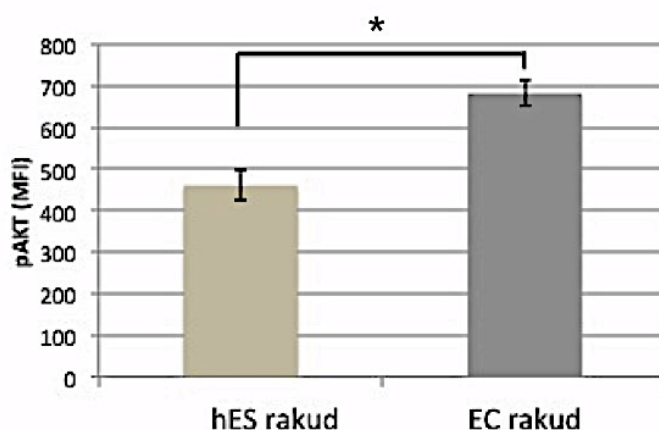
2.2.5.3 Läbivoolutsütomeetriga teostatud mõõtmistel saadud andmete analüüs

Rakke analüüsiti läbivoolutsütomeetriga FACSAria I (BD Biosciences) kasutades programmi FACS-DiVa 6.1.3 (BD Biosciences). Iga proovi kohta detekteeriti 10 000 sündmust. Vaatlemaks ainult spetsiifilisest antikeha seondumisest tingitud efekti kasutati isotüübi kontrolli. Seejuures käsitleti pAKT positiivsetena rakke, mille emiteeritav fluoretsentssignaali oli intensiivsem isotüübi kontrolli põhjal määratud väärtusest. pAKT-i taseme arvuliseks kirjeldamiseks kasutati vastavat rakupopulatsiooni iseloomustavat fluoretsentsi intensiivsuse mediaanväärtust (MFI, ingl *median fluorescence intensity*). OCT4 taseme hindamisel vaadati, kuidas muutub OCT4 positiivsete rakkude osakaal proovide lõikes. OCT4 positiivsete ja negatiivsete rakkude eristamiseks kasutatud piirväärtus määrati kontrollproovi põhjal.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 AKT-i ekspressioon hES ja EC rakkudes

AKT kontrollib olulisi rakusiseseid protsesse, kuid siiski leidub rakuliine, mis ei ekspresseeri kõiki AKT-i isovorme (Zinda *et al.*, 2001). Sellest lähtuvalt kontrolliti antud bakalaureusetöö eksperimentaalses osas esmalt AKT-i erinevate isovormide ekspressiooni hES ja EC rakkudes. Immunofluoresentsmikroskoopiat kasutades tuvastati nii AKT1, AKT2, AKT3 kui ka pAKT olemasolu vastavates rakutüüpides (Lisa 2). See on kooskõlas eelnevate uuringutega, mis on näidanud, et AKT-i isovormid on ekspresseeritud hES rakkudes (Eiselleova *et al.*, 2009) ja EC rakuliinis 2102Ep (Josephson *et al.*, 2007). Lisaks täheldati nii visuaalsel hinnangul kui ka kvantitatiivsete mõõtmiste põhjal, et aktiveeritud AKT-i tase on EC rakkudes kõrgem kui hES rakkudes. Keskmiselt oli pAKT-i tase EC rakkudes 1,5 korda kõrgem kui hES rakkudes (joonis 5). Saadud tulemus on ootuspärane, sest on näidatud AKT-i üleaktiveeritust mitmetes kasvajates (Testa ja Tschlis, 2005). Kõrgem pAKT tase võib olla saavutatud läbi PTEN ekspressiooni inhibeerimise EC rakkudes. On näidatud, et EC rakkudes on PTEN ekspressioonitase madalam võrreldes normaalse testise rakkudega (Di Vizio *et al.*, 2005).



Joonis 5. pAKT-i tase hES ja EC rakkudes. Keskmise pAKT-i tase, mis leiti kuue kontrollproovi põhjal, on EC rakkudes ligikaudu 1,5 korda kõrgem kui hES rakkudes. Saadud tulemus on statistiliselt oluline (* $P < 0,05$; Studenti t-test). Veapiiridena on esitatud standardviga (SEM, ingl *standard error of the mean*). Graafiku y-teljel on pAKT-i taset iseloomustav fluoretsi intensiivsuse mediaanväärtus (MFI, ingl *median fluorescence intensity*).

2.3.2 Inhibiitori kontsentratsiooni optimeerimine rakkude morfoloogia põhjal

Eelnevalt on näidatud, et uurides NSC156529 mõju inimese embrüonaalsetele neerurakkudele ning inimese hepatoomi rakkudele on sobivaks inhibiitori kontsentratsiooniks 4 μM ja inkubeerimisajaks 4 tundi. Sellistel tingimustel ei esine märkimisväärset tsütotoksilist efekti,

kuid on täheldatav mõju rakkude omadustele (Maemets-Allas *et al.*, 2015). Leidmaks optimaalset varianti hES ja EC rakkude jaoks uuriti inhibiitori erinevate kontsentratsioonide (vahemikus 0,5–20 μM) mõju rakkudele 4-tunnise inkubeerimise tulemusel. Selleks hinnati visuaalselt rakkude elulemust valgusmikroskoobiga. Seejuures käsitleti rakke surnuna, kui need ei kinnitunud enam kasvupinnale. Elulemuse hindamise tulemusena kasutati töös inhibiitori kontsentratsioone vahemikus 2–5 μM . Alates 5 μM kontsentratsioonist täheldati märkimisväärset toksilist efekti rakkudele ja seetõttu antud töö raames kõrgemaid kontsentratsioone ei kasutatud (Lisa 3). Lähtuvalt eesmärgist vältida toksilist efekti rakkudele inkubeeriti põhikatses rakke inhibiitoriga 3 tundi. Alternatiivse variandina lühiajalisele inkubeerimisele kõrgematel kontsentratsioonidel on tulevikus võimalik kasutada madalamatel (<1 μM) kontsentratsioonidel inkubeerimist pikema aja vältel. See võimaldaks vaadata, kas PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitori mõjutab pluripotentsusfaktorite ekspressiooni ning põhjustab rakkude diferentseerumist. Oluline on arvestada, et pikaajalisel inhibiitori juuresolekul võivad rakud aga kohaneda ja võtta kasutusele kompensatoorsed mehhanismid AKT-i aktiivsuse säilitamiseks (näiteks reguleerides fosfataaside funktsioneerimist)(Ellwood-Yen *et al.*, 2011).

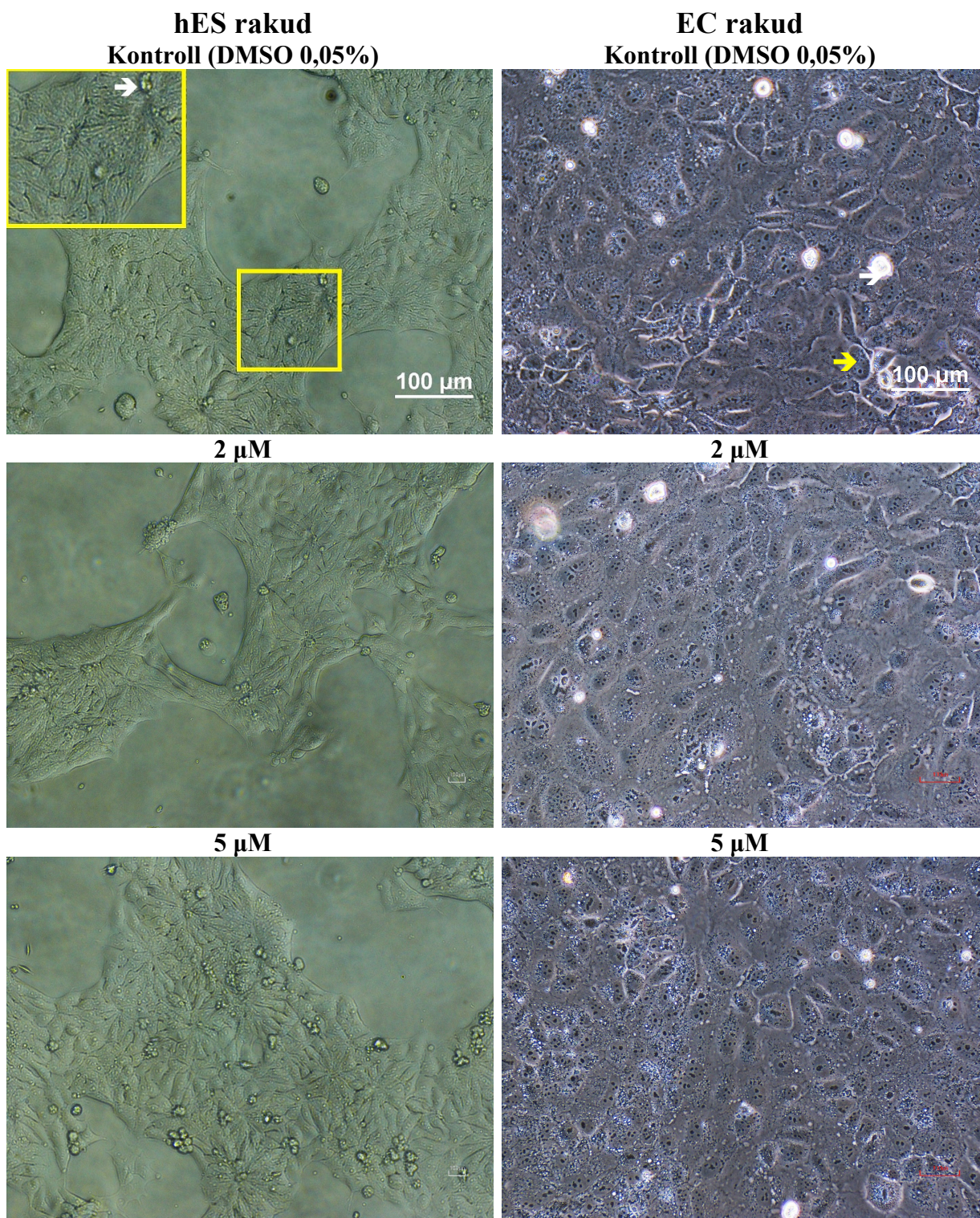
2.3.3 Inhibiitori mõju hES ja EC rakkudele tavapärasel söötmes

Varasemalt on täheldatud, et kasvajakud ja normaalsed somaatilised rakud on PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitori suhtes erineva tundlikkusega (Maemets-Allas *et al.*, 2015). Käesolevas bakalaureusetöös näidati, et EC rakkudes on kõrgem pAKT-i tase kui hES rakkudes. Sellest lähtuvalt uuriti, kas ja kuidas muutub pAKT-i tase hES ja EC rakkudes inhibiitori toimetel.

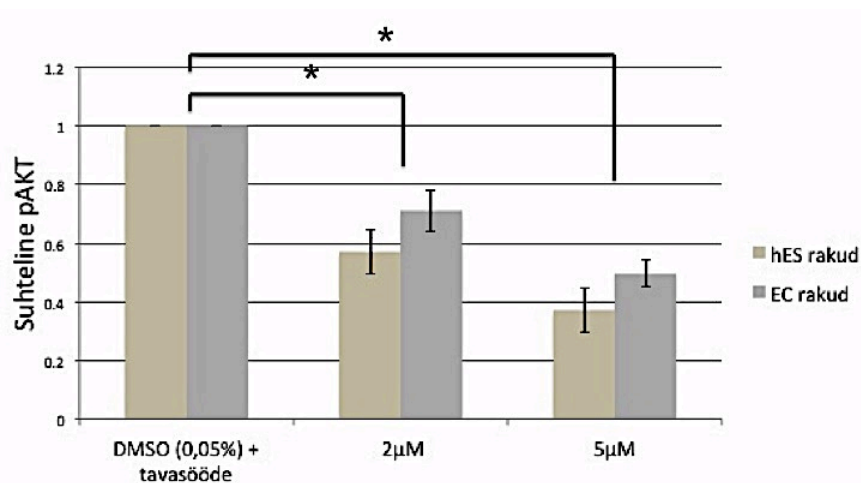
Peale 3-tunnist inkubeerimist erinevatel inhibiitori kontsentratsioonidel (2–5 μM) kasutati valgusmikroskoopi rakkude morfoloogia hindamisel. Visuaalsel vaatlusel nähti, et kontrollproovides esinevad üksikud kinnitumata hES rakud (joonis 6). Surnud rakkude osakaal suurenes 5 μM inhibiitori kontsentratsiooniga kannudes, kuid jäi kontrolliga võrreldavale tasemele 2 μM inhibiitori juuresolekul. EC rakkude puhul ei täheldatud erinevusi kontrollproovi ja inhibiitoriga proovide vahel. Kõrgematel inhibiitori kontsentratsioonidel täheldatavat tsütotoksilist efekti on võimalik seletatada pAKT-i antiapoptootilise rolliga (Kulik *et al.*, 1997). Võib eeldada, et inhibiitori toimetel langenud pAKT-i tase ei ole enam piisav apoptoosi vältimiseks. EC rakkudes ei suurene surnud rakkude hulk inhibiitori toimetel tõenäoliselt seetõttu, et AKT-i aktiveeritus säilib isegi languse järgselt tasemel, mis on vajalik rakkude ellujäämiseks. Selle väite kontrollimiseks teostati läbivoolutsütomeetriline analüüs, mille eesmärgiks oli hinnata inhibiitori mõju pAKT-i (T308) tasemele rakkudes. Antud töös

vaadati T308 fosforüleeritust, sest see on positsioon, millele lisab fosfaatühma PDPK1. PDPK1 on kinaas, mille funktsioneerimist takistab töös kasutatav inhibiitor NSC156529. Lisaks näitab T308 fosforüleerituse olulisust fakt, et see on tingimata vajalik AKT-i aktiivsuseks. Näiteks aktiveerib T308 pAKT oma substraadi mTORC1 isegi juhul kui S473 on fosforüleerimata (Vadlakonda *et al.*, 2013). Käesolevas töös nähti, et proovides, milles inhibiitori kontsentratsioon oli 2 μ M ja 5 μ M, langes keskmine pAKT-i tase hES rakkudes võrreldes kontrolliga vastavalt 1,7 ja 2,7 korda. EC rakkudes langes 2 μ M inhibiitori kontsentratsioonil pAKT-i tase 1,4 korda ning 5 μ M kontsentratsioonil 2 korda. Seega alaneb inhibiitori toimet pAKT-i tase hES ja EC rakkudes kontsentratsioonist sõltuvalt. Seejuures toimub inhibiitori toimet hES rakkudes suurem langus pAKT-i tasemes kui EC rakkudes.

Nii visuaalse vaatluse kui ka läbivoolutsütomeetrilise analüüsi põhjal on hES rakud inhibiitori suhtes tundlikumad kui EC rakud. Rakkude erinev tundlikkus võib olla tingitud erinevustest AKT-i signaaliraja komponentide ekspressioonis. EC rakkudes on kõrgem basaalne pAKT-i tase ja madalam PTEN ekspressioon, mistõttu on vastavad rakud PI3K/AKT signaaliraja inhibeerimisest vähem sõltuvad (Vadlakonda *et al.*, 2013; Di Vizio *et al.*, 2005). Kuigi varasemalt on näidatud, et inhibiitori mõju kasvajakakkudele on tugevam kui normaalsetele somaatilistele rakkudele (Maemets-Allas *et al.*, 2015), tuleb arvestada, et käesolevas töös kasutati kasvaja tüvirakke (CSC). CSC-sid iseloomustab teistest kasvajakakkudest erinev geeniekspressiooni ja signaaliradade regulatsioon, millest tingitult on CSC-d mitmete vähiravimite suhtes resistentsed (Chen *et al.*, 2013).



Joonis 6. Inhibiitori mõju hES ja EC rakkude elulemusele. 3-tunnisel inhibiitoriga inkubeerimisel suureneb surnud hES rakkude osakaal inhibiitori kontsentratsioonist sõltuvalt. EC rakkudega proovides ei täheldatud kinnitumata rakkude hulga suurenemist. Valge nool viitab kinnitumata ja kollane nool kasvupinnale kinnitunud rakule.



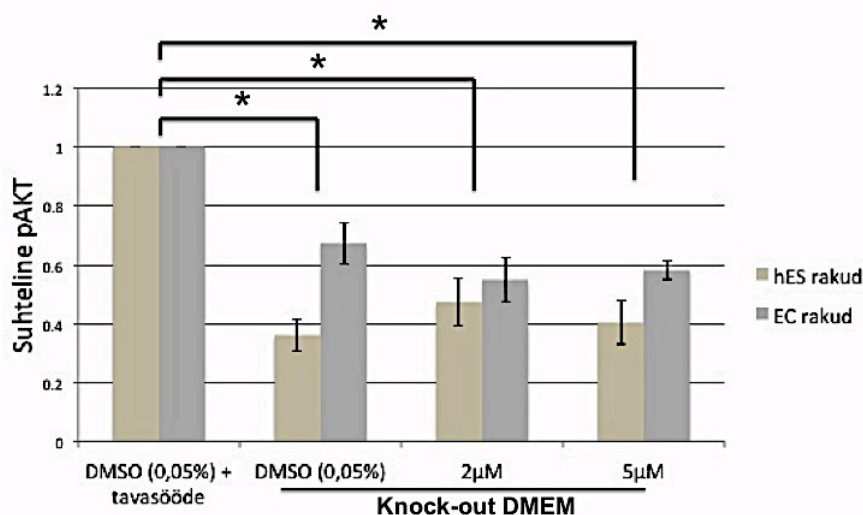
Joonis 7. Tavapärasesse söötmesse lisatud inhibiitor põhjustab pAKT-i taseme languse hES ja EC rakkudes. Nähti, et inhibiitori toime langeb pAKT-i tase hES ja EC rakkudes kontsentratsioonist sõltuvalt. Tulemused normaliseeriti kontrollproovi (DMSO) suhtes ehk pAKT-i tase kontrollproovis võrdsustati ühega. Joonisel on kolme korduse keskmine pAKT-i tase. Veapiiridena on esitatud standardviga (SEM, ingl *standard error of the mean*). Statistiliseks analüüsiks kasutati Studenti t-testi ning tärniga on tähistatud proovid, milles pAKT-i tase on kontrollproovist oluliselt erinev (* $P < 0,05$).

2.3.4 Insuliini mõju inhibiitori toimele

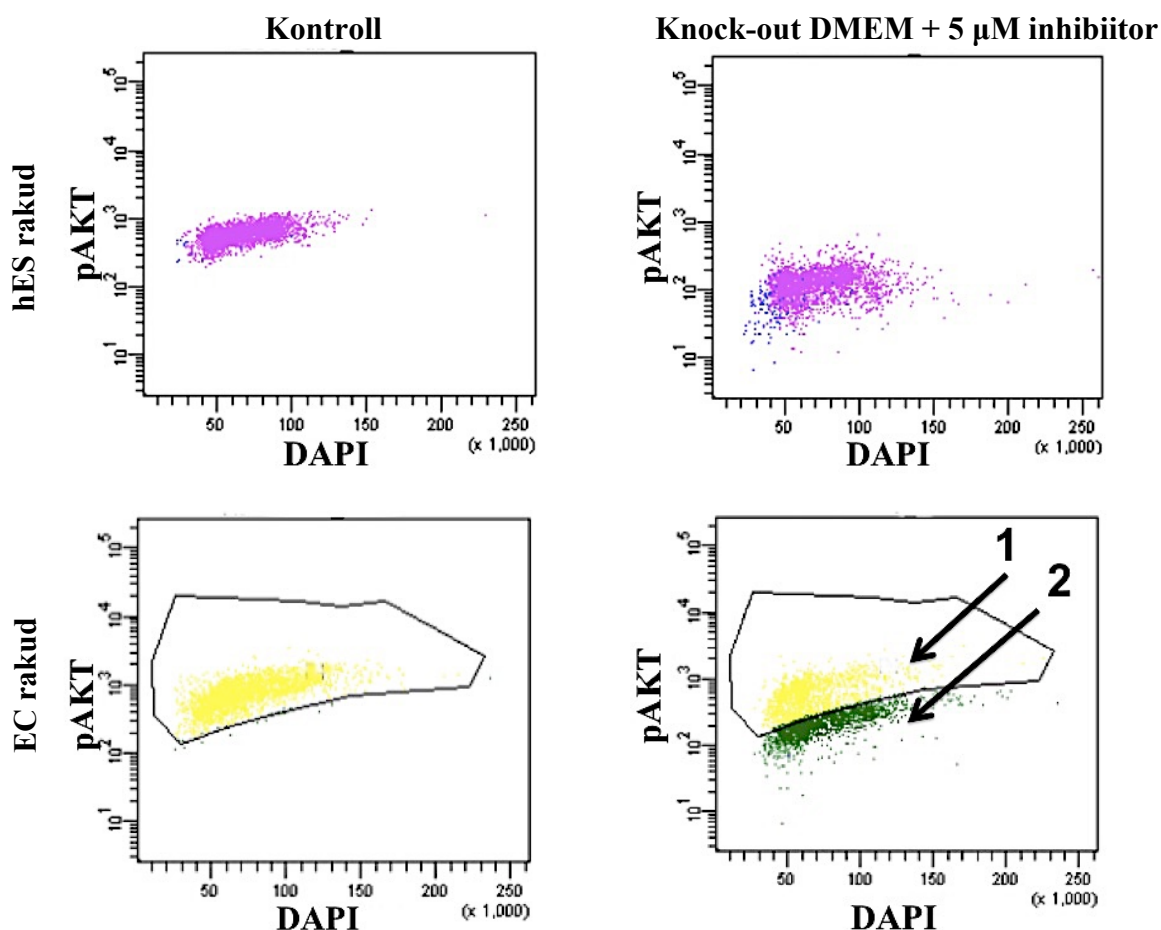
Varasemalt on näidatud, et insuliin indutseerib AKT1 fosforüleerimist (Alessi *et al.*, 1996) ning et PDPK1 inhibiitor suudab langetada pAKT-i taset rakkudes vaid madala PI3K aktiivsuse korral. Madala PI3K aktiivsuse saavutamiseks on vaja eemaldada söötimest vastavat signaalirada aktiveerivad faktorid (nt insuliin) (Medina, 2013). Eelnevatest tulemustest lähtuvalt vaadati, kuidas kasvukeskkonnas sisalduv insuliin mõjutab PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitori toimet.

Insuliini olulisuse uurimiseks inkubeeriti rakke knock-out DMEM söötmes, millele oli lisatud erinevas kontsentratsioonis inhibiitorit (0–5 µM). Knock-out DMEM on seerumivaba sööde, mis ei sisalda rakkude pikaajaliseks kultiveerimiseks vajalikke kasvufaktoreid. Nähti, et knock-out DMEM söötmes inkubeeritud rakkudes langes pAKT-i tase võrreldes rakkudega, mis kasvasid igapäevasel kultiveerimisel kasutatavas söötmes (joonis 8). Kui lisaks kasvufaktorite eemaldamisele lisati hES rakkudele inhibiitorit, siis ei täheldatud täiendavat pAKT-i taseme langust. Saadud tulemuse üheks võimalikuks seletuseks on minimaalne vajalik pAKT-i tase rakkude ellujäämiseks. pAKT-i taseme langetamine kriitilisest väärtusest alla poole on tagaside kaudu toimuva regulatsiooni tõttu raskendatud. EC rakkudes vähenes samuti pAKT-i tase vastusena kasvufaktorite eemaldamisele, kuid seejuures oli langus ligi 2 korda väiksem, kui hES rakkude puhul. See kinnitab varasemat tähelepanekut, et EC rakud on

välistest faktoritest vähem sõltuvad kui normaalsed rakud (Hanahan ja Weinberg, 2000). Sarnaselt hES rakkudele ei toimunud täiendavat pAKT-i taseme langust EC rakkudes, kui knock-out DMEM söötmesse lisati inhibiitorit. Lisaks märgati, et kasvufaktorite eemaldamisel ja inhibiitori lisamisel langeb pAKT-i tase kõikides hES rakkudes (joonis 9). EC rakkude puhul eristub mõjutuste toimet aga kaks rakupopulatsiooni, millest ühe moodustavad rakud, milles pAKT-i tase on säilinud kontrollprooviga võrreldaval tasemel. Teise populatsiooni kuuluvad rakud, milles on toimunud oluline pAKT-i taseme langus. Seega on vastavat proovi iseloomustav keskmine pAKT-i taseme langus tingitud madala pAKT-i tasemega rakkude osakaalu suurenemisest. Seejuures on pAKT-i tase nõ alumises populatsioonis keskmiselt 2,5 korda madalam kui ülemises populatsioonis. Varasemalt on näidatud, et erinevate valgu tasemetega alampopulatsioonide moodustumine toimub kasvajarakkudes vastusena vähiteraapiale (Cohen *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2010). Selline heterogeensuse tekitamine võimaldab kasvajarakkudel vältida kogu populatsiooni hävingut (Yuan *et al.*, 2011). Siiani on aga selgusetu, millest on tingitud esmapilgul identsete rakkude erinev reaktsioon ravimitele. Lisaks ei ole varem näidatud alampopulatsioonide moodustumist kasvaja tüvirakkude hulgas. Valdavalt peetakse CSC-sid vähiteraapia suhtes resistentseteks (Dean *et al.*, 2005), kuid käesolevas töös saadud tulemused viitavad tundlikkuse populatsioonisisesele varieeruvusele.

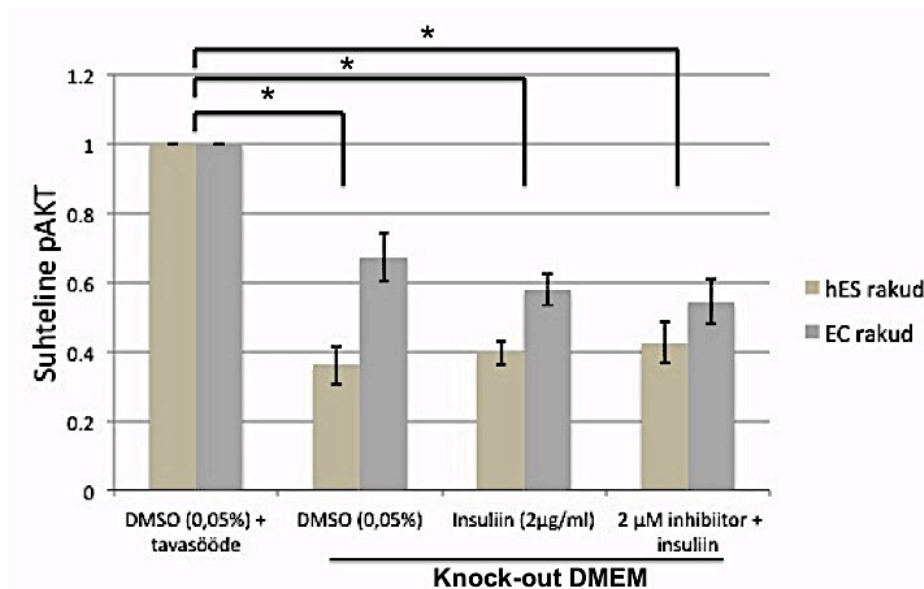


Joonis 8. Inhibiitori mõju pAKT-i tasemele hES ja EC rakkudes knock-out DMEM söötmes. Kasvufaktorite eemaldamine põhjustab märkimisväärse pAKT-i taseme languse hES ja EC rakkudes. Inhibiitori lisamisel ei toimu aga täiendavat pAKT-i taseme alanemist. Tulemused normaliseeriti kontrollproovi (DMSO + tavasööde) suhtes. Joonisel on kolme korduse keskmine pAKT-i tase. Veapiiridena on esitatud standardviga (SEM, ingl *standard error of the mean*). Statistiliseks analüüsiks kasutatati Studenti t-testi (* $P < 0,05$).



Joonis 9. pAKT-i taseme langus hES ja EC rakkudes. hES rakkude korral langeb pAKT-i tase kõikides vaadeldava populatsiooni rakkudes. EC rakkude korral eristub aga langenud pAKT-i tasemega rakkude alampopulatsioon. 1 – kontrollproovile vastava pAKT-i taseme säilitanud rakkudest moodustunud alampopulatsioon, 2 – langenud pAKT-i tasemega rakkudest moodustunud alampopulatsioon. Inkubeerides EC rakke knock-out DMEM söötmes, millesse on lisatud inhibiitorit (lõppkontsentratsiooniga 5 μ M), on alampopulatsioonis 1 pAKT-i tase 2,9 korda kõrgem kui alampopulatsioonis 2.

Uurimaks, kas knock-out DMEM söötmes esinev pAKT-i taseme langus on põhjustatud insuliini puudumisest, kasutati knock-out DMEM söödet, millele oli lisatud insuliini. Nähti, et pAKT-i tase rakkudes, mida inkubeeriti insuliini sisaldavas knock-out DMEM söötmes, oli võrreldav ainult knock-out DMEM söötmes inkubeeritud rakkude pAKT-i tasemega (joonis 10). Varasemalt on märgatud, et insuliin on oluline PI3K/AKT/mTOR signaaliraja aktiveerimisel. Saadud tulemused aga näitavad, et vaid insuliinist ei piisa, et säilitada hES ja EC rakkudes basaalsele vastav pAKT-i tase. Seega on AKT-i funktsioneerimisel kriitilise tähtsusega ka teised söötmes leiduvad kasvufaktorid (näiteks fibroblasti kasvufaktor, FGF, ingl *fibroblast growth factor*)(Alessi *et al.*, 1996).



Joonis 10. Inhibiitori ning insuliini mõju pAKT-i tasemele hES ja EC rakkudes. Ainult insuliinist ei piisa kontrollproovile vastava pAKT-i taseme säilitamiseks hES ja EC rakkudes. Tulemused normaliseeriti kontrollproovi (DMSO + tavasööde) suhtes. Joonisel on kolme korduse keskmine pAKT-i tase. Veapiiridena on esitatud standardviga (SEM, ingl *standard error of the mean*). Statistiliseks analüüsiks kasutati Studenti t-testi (* $P < 0,05$).

2.3.5 Inhibiitori mõju OCT4 tasemele

Varasemalt on näidatud, et AKT on oluline hES rakkude pluripotentsuse säilitamisel (Alva *et al.*, 2011). Lisaks on täheldatud, et AKT mõjutab EC rakkude diferentseerumist läbi pluripotentsusfaktori OCT4 fosforüleerimise. Fosforüleeritud kujul on OCT4 stabiilsem ning tagab tüvirakkude diferentseerumata oleku (Lin *et al.*, 2012). Sellest lähtuvalt uuriti, kas pAKT-i taseme langus toob kaasa ka OCT4 hulga vähenemise hES ja EC rakkudes.

Läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil tuvastati, et nii inhibiitori lisamine kui ka kasvufaktoritega söötme asendamine knock-out DMEM söötmega põhjustab OCT4 taseme languse hES rakkudes. Seejuures nähti, et kõige enam väheneb OCT4 positiivsete rakkude osakaal proovides, milles kasutati knock-out DMEM söödett, kuhu oli lisatud inhibiitorit. Kontrollproovis oli 98,9% rakkudest OCT4 positiivsed (joonis 11). Knock-out DMEM söötmes 2 µM ja 5 µM inhibiitori kontsentratsioonil aga vastavalt 95,5% ja 89,5%. Ulatuslikum muutus toimus ka insuliiniga knock-out DMEM söötmes, millele oli lisatud inhibiitorit ja kus OCT4 positiivsete rakkude osakaal langes 94,1%-ni. Saadud tulemused viitavad sellele, et AKT on signaalirajas OCT4-st ülevalpool, sest kõikides rakkudes, milles on langenud pAKT-i tase ei ole veel muutunud OCT4 sisaldus. Vastava väite tõestamiseks peaks uurima, kuidas mõjutab PI3K/AKT/mTOR signaaliraja alguskomponentide (nt PI3K) inhibeerimine pAKT-i ja OCT4 taset.

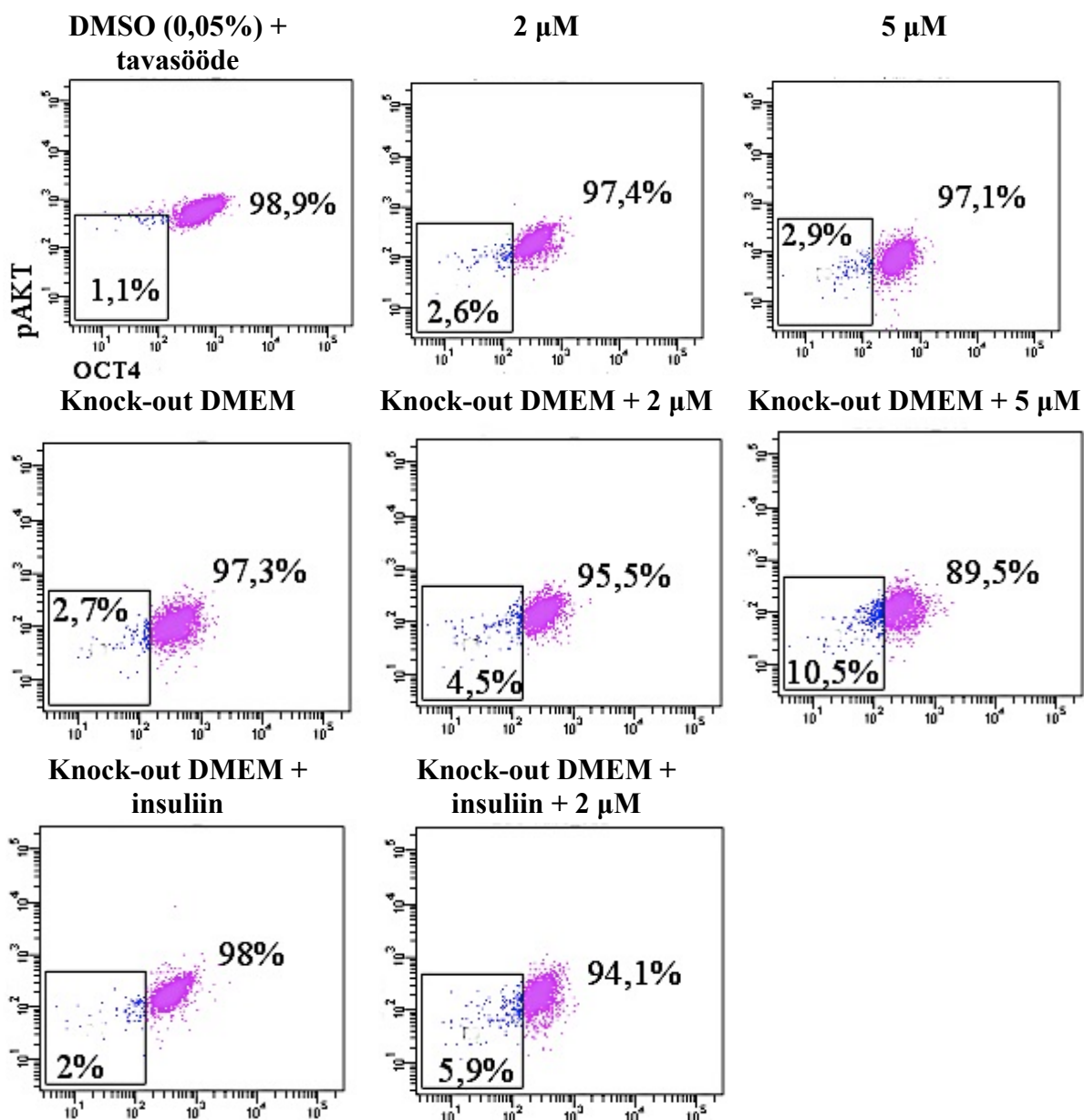
Eelnevalt nähti, et pAKT-i tase langeb kõikides knock-out DMEM söötmega hES rakkude proovides võrdsel määral. Olenemata sellest täheldati suuremat OCT4 taseme vähenemist topeltnõutusega proovides. Eeldatavasti põhjustab kasvufaktorite eemaldamine ja inhibiitori lisamine kiirema pAKT-i taseme languse kui ainult kasvufaktorite eemaldamine või inhibiitori lisamine. Antud väite kontrollimiseks peab uurima, kuidas muutub pAKT-i tase erinevates proovides lühemate ajavahemike jooksul. Täheldatud muutused OCT4 tasemes on küll väikesed, kuid seejuures tuleb arvestada, et langus on vaid 3 tunnise inkubeerimise tulemus. Pluripotentsete tüvirakkude diferentseerumine võtab aega päevi ning seejuures on ulatuslikumad muutused transkriptsioonifaktorite ekspressioonis tuvastatavad 48 tundi peale pAKT-i taseme langust (Singh *et al.*, 2012; Thomson *et al.*, 2011). Saadud tulemused annavad lootust uuritava molekuli kasutamiseks rakuteraapias, sest on näidatud, et OCT4 taseme langus indutseerib hES rakkude diferentseerumist endodermaalses suunas (Hay *et al.*, 2004). Endodermaalset päritolu on näiteks pankrease β -rakud, mille hävimine põhjustab diabeeti.

Sarnaselt hES rakkudele nähti OCT4 taseme langust ka EC rakkudes, mida oli inkubeeritud kontrollproovist erinevatel tingimustel. Seejuures on tähelepanuväärne, et OCT4 positiivsete rakkude hulk erineva mõjutusega proovides vähenes olulisemal määral kui vastavates hES rakkudega proovides. Kontrollproovis oli OCT4 positiivsete rakkude osakaal 91,5%, kuid juba 2 μ M inhibiitori kontsentratsioonil tavasöötmes langes 63,7%-ni (joonis 12). Eelnevalt ei täheldatud inhibiitoriga proovis surnud rakkude osakaalu suurenemist võrreldes kontrollprooviga. See näitab, et kõrge pAKT-i tase ei ole EC rakkude ellujäämiseks tingimata vajalik, kuid on ääretult oluline pluripotentsuse tagamiseks. Selle tõestuseks on langenud pAKT-i tasemega alampopulatsioonis ka OCT4 tase madalam kui kõrgema pAKT-i tasemega alampopulatsioonis (joonis 13). Seega põhjustab aktiveeritud AKT-i vormi vähenemine märkimisväärse languse pluripotentsusfaktori tasemes. Täheldatud muutus on olulise tähtsusega, sest alanenud OCT4 sisaldus indutseerib kasvaja tüvirakkude diferentseerumise, millega kaasneb nende prolifereerumisevõime vähenemine (Matin *et al.*, 2004).

Antud bakalaureusetöös nähti, et korrelatsioon pAKT-i taseme ja OCT4 positiivsete rakkude osakaalu vahel on EC rakkudes tugevam kui hES rakkudes (joonis 14). Seejuures on varem näidatud, et nii hES kui ka EC rakkudes kaitseb AKT-i poolt lisatud fosfaatühik OCT4 proteasoomis lagundamise eest (Campbell ja Rudnicki, 2013; Lin *et al.*, 2012). Saadud tulemused viitavad sellele, et EC rakkudes degradeeritakse fosforüleerimata, kuid ubikvitinüleeritud OCT4 kiiremini kui hES rakkudes. See võib olla mehhanism, mis aitab

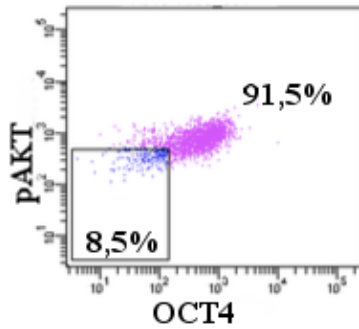
kasvaja tüvirakkudel vältida OCT4 taseme tõusu, mis põhjustaks samuti diferentseerumise ja seeläbi proliferumisvõime vähenemise (Niwa *et al.*, 2000).

Saadud tulemuste kinnitamiseks ja diferentseerumise uurimiseks on vaja teha korduskatsed ning jälgida inhibiitori mõju pikemas ajaskaalas. hES rakkude puhul eeldaks see madalama inhibiitori kontsentratsiooniga töötlust pikema aja vältel, et põhjustada olulisemat langust OCT4 tasemes, kuid vältida tsütotoksilist efekti. Seejuures oleks soovitav, et inhibiitor indutseeriks rakkude spetsialiseerumist, millega kaasneb ka jagunemisvõime vähenemine. Pikema töötluse muudab keeruliseks rakkude kohanemine ja kompensatoorsete mehhanismide kasutusele võtmine. Üks võimalus rakkude vastureaktsiooni vältimiseks oleks mitmete inhibiitorite kombineeritud kasutamine (Ellwood-Yen *et al.*, 2011). Lisaks on oluline uurida, kas inhibiitori mõju OCT4 tasemele on pöörduv.

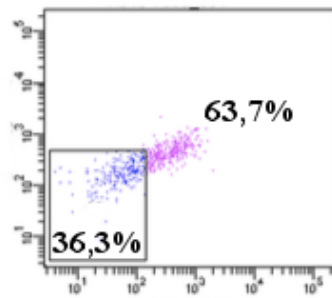


Joonis 11. OCT4 positiivsete hES rakkude osakaal langeb kasvufaktorite eemaldamisel ning inhibiitori lisamisel. Graafiku y-teljel on pAKT-i ning x-teljel OCT4 taset iseloomustav fluoresentsi intensiivsus. Numbrilised väärtused kirjeldavad OCT4 positiivsete ning negatiivsete rakkude osakaalu antud proovides. Vastavate rakkude eristamiseks kasutatud piirväärtus määrati kontrollproovi põhjal. Joonisel on esitatud ühe korduse tulemused.

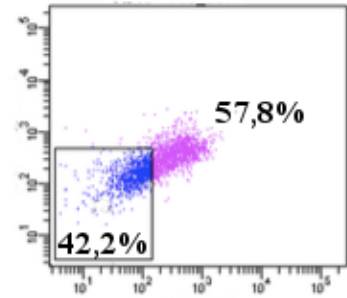
DMSO (0,05%) + tavasööde



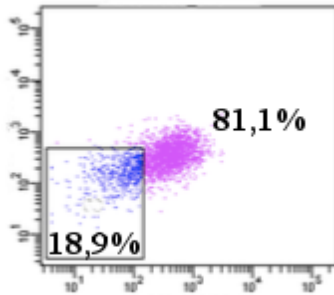
2 μ M



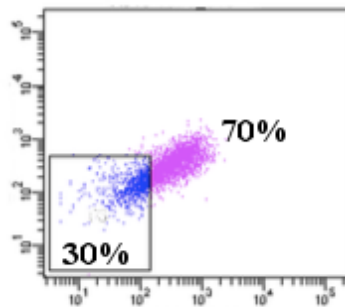
5 μ M



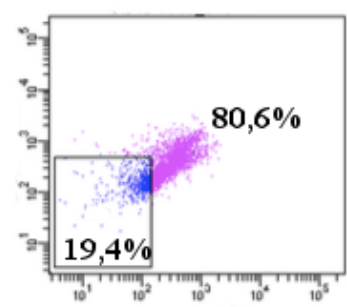
Knock-out DMEM



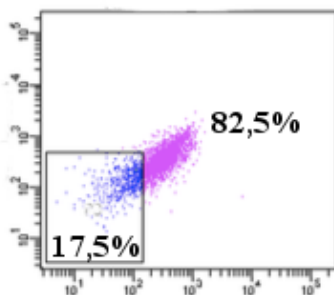
Knock-out DMEM + 2 μ M



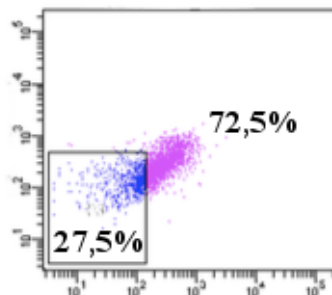
Knock-out DMEM + 5 μ M



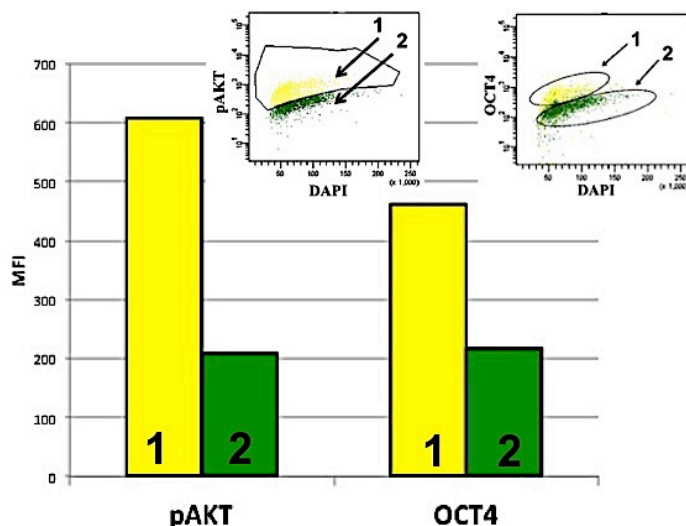
Knock-out DMEM +
insuliin



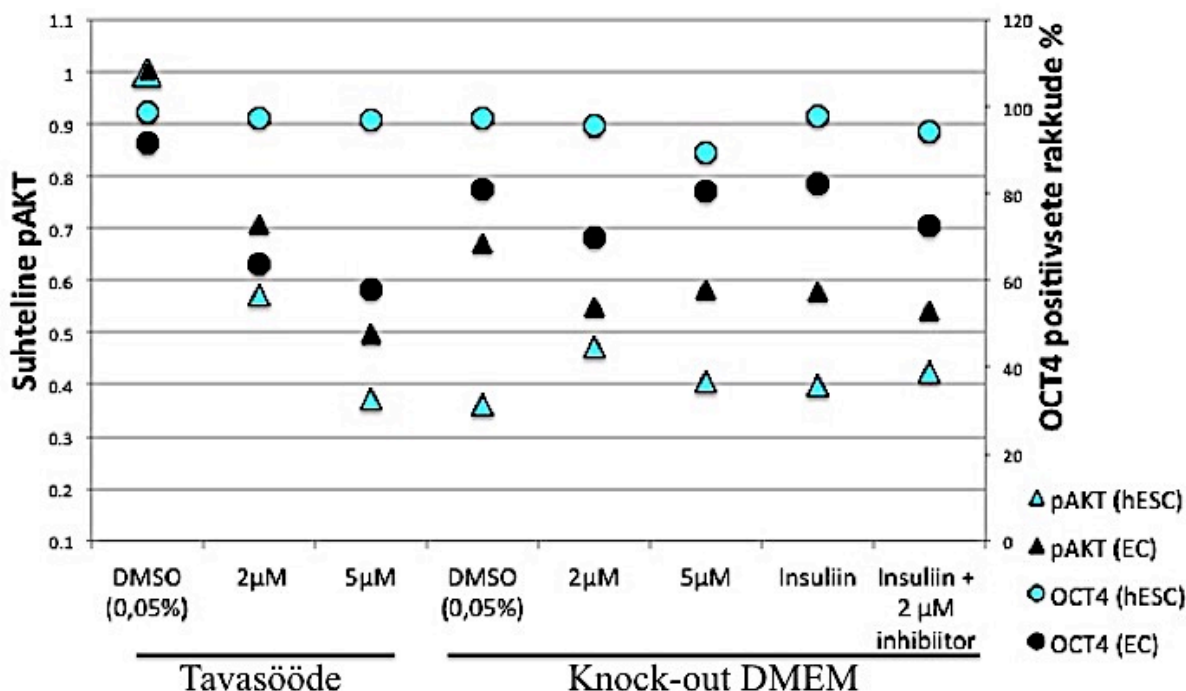
Knock-out DMEM +
insuliin + 2 μ M



Joonis 12. EC rakkude hulgas väheneb inhibiitori toimetel OCT4 positiivsete rakkude osakaal märkimisväärselt. Graafiku y-teljel on pAKT-i ning x-teljel OCT4 taset iseloomustav fluoretsentsi intensiivsus. Numbrilised väärtused kirjeldavad OCT4 positiivsete ning negatiivsete rakkude osakaalu antud proovides. Vastavate rakkude eristamiseks kasutatud piirväärtus määrati kontrollproovi põhjal. Joonisel on esitatud ühe korduse tulemused.



Joonis 13. pAKT-i ja OCT4 tase EC rakkude alampopulatsioonides (knock-out DMEM + 5 μ M inhibiitor proovi näitel). 1 – kontrollproovile vastava pAKT-i taseme säilitanud rakkudest moodustunud alampopulatsioon, 2 – langenud pAKT-i tasemega rakkudest moodustunud alampopulatsioon. Graafiku y-teljel on pAKT-i ja OCT4 taset iseloomustav fluoretsi intensiivsuse mediaanväärtus (MFI). Langenud pAKT-i tasemega alampopulatsiooni iseloomustab ka madalam OCT4 tase. Seejuures on alampopulatsioonis 2 pAKT-i tase 2,9 ja OCT4 tase 2,1 korda madalam kui alampopulatsioonis 1.



Joonis 14. Korrelatsioon pAKT-i taseme ja OCT4 positiivsete rakkude vahel. pAKT-i taseme langus EC rakkudes põhjustab ka OCT4 positiivsete rakkude osakaalu vähenemise vastavates proovides. hES rakkudes kaasneb oluline OCT4 taseme vähenemine vaid kasvufaktorite eemaldamisest ja inhibiitori lisamisest tingitud pAKT-i taseme langusega. Graafiku primaarsel y-teljel on suhteline pAKT-i tase (normaliseeritud kontrollproovi suhtes) ning sekundaarsel y-teljel OCT4 positiivsete rakkude osakaal vastavates proovides. Joonisel on esitatud ühe korduse tulemused.

KOKKUVÕTE

Inimese embrüonaalsed tüvirakud (hES rakud) on pluripotentsed rakud, mis on saadud inimese varases embrüonaalses arengus moodustunud sisemisest rakumassist. Inimese embrüonaalsed kartsinoomi (EC) rakud on kasvaja tüvirakud, mida peetakse hES rakkude halvaloomulisteks vasteteks. Mõlemale rakutüübile on iseloomulik jagunemis- ning diferentseerumisvõime, mis on osaliselt saavutatud läbi PI3K/AKT/mTOR signaaliraja aktiveerimise.

Käesolevas töös uuriti kahe PI3K/AKT/mTOR signaaliratta kuuluva kinaasi, PDPK1 ja AKT1, vahelise interaktsiooni inhibiitori mõju hES ja EC rakkudele. Selleks jälgiti muutusi fosforüleeritud AKT-i (pAKT) ning OCT4 tasemes. Katsete tulemusena nähti, et PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitori toime langeb pAKT-i tase hES ja EC rakkudes. Seejuures on keskmine pAKT-i taseme langus EC rakkudes väiksem kui hES rakkudes. Oluline on aga täheldatud alampopulatsioonide moodustumine EC rakkude puhul, mis näitab tundlikkuse populatsioonisest varieeruvust. Lisaks märgati, et inhibiitor ei põhjusta täiendavat pAKT-i taseme langust madala PI3K raja aktiveerituse korral. See viitab minimaalsele pAKT-i tasemele, mille säilitamine on tüvirakkude jaoks elulise tähtsusega. Lisaks näidati, et ainult insuliinist ei piisa PI3K signaaliraja aktiveerimiseks hES ja EC rakkudes.

Täiendavalt uuriti, kas inhibiitori indutseeritud pAKT-i taseme langus toob kaasa ka muutused pluripotentsusfaktori OCT4 tasemes. Leiti, et pAKT-i taseme langus põhjustab märkimisväärse OCT4 positiivsete EC rakkude hulga vähenemise. See näitab, et PI3K/AKT signaalirada on EC rakkude pluripotentsuse säilitamisel väga oluline. Seejuures on tähelepanuväärne, et EC rakkudes langes pAKT-i tase vähem, kuid OCT4 tase enam kui hES rakkudes.

Käesoleva töö tulemuste põhjal on PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitor potentsiaalne raku- ning vähiteraapias kasutatav molekul. Vastava ühendi olulisust näitab võime langetada pluripotentsuse tagamiseks vajalike valkude taset hES ja EC rakkudes. Seejuures on kasvaja tüvirakkude arengupotentsiaali vähendamine vähiteraapias kriitilise tähtsusega. Testimaks uuritava molekuli sobivust kliinilisteks rakendusteks tuleb esmalt vaadelda ühendi mõju rakkudele pikemas ajaskaalas. Tuleks jälgida, kas pAKT-i taseme langusest tingitud OCT4 taseme alanemisega kaasneb ka rakkude diferentseerumine ja proliferatsioonivõime vähenemine.

The effect of PDPK1-AKT1 interaction inhibitor on human embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells

Egle-Helene Ervin

SUMMARY

Human embryonic stem (hES) cells, derived from the inner cell mass of early stage embryos, are pluripotent cells which are able to generate all cell types of human body. Embryonal carcinoma (EC) cells are pluripotent stem cells derived from teratocarcinomas and are considered the malignant counterparts of hES cells. The pluripotency of both cell type is maintained through PI3K/AKT/mTOR pathway activation.

The aim of this study was to investigate how inhibiting a kinase of PI3K/AKT/mTOR pathway, PDPK1, influences hES and EC cells. Therefore we used flow cytometry analysis to detect phosphorylated AKT (pAKT) levels in the cells. Activated AKT is important for stem cells' undifferentiated and proliferative phenotype. We found out that treatment with PDPK1-AKT1 interaction inhibitor results in decrease of pAKT levels in both cell types. Furthermore, we observed that EC cells' pAKT levels are more resistant to inhibitor than hES cells' which refers to their malignancy and cancerous origin. However, we noticed that there still are sensitive EC cells which form a distinct subpopulation after treatment with inhibitor. We also studied the effects of growth factors on pAKT levels and observed that insulin is not sufficient to activate PI3K/AKT/mTOR pathway in hES and EC cells.

It has been shown that PI3K signalling pathway interacts with pluripotency network. In the light of previous studies we wanted to find out whether the changes in pAKT levels cause decrease in OCT4 levels. OCT4 is a pluripotency marker which is downregulated upon differentiation. We observed a decreased OCT4 levels in hES and EC cells. This is remarkable because differentiation of hES cells creates somatic cells for regenerative medicine and differentiation of EC cells reduces their proliferative capacity. The latter is extremely important in cancer therapy. Interestingly, we noticed a greater reduction of OCT4 levels in EC cells compared to hES cells. That indicates how important PI3K/AKT signalling pathway is for EC cells' pluripotency.

The results show that PDPK1-AKT1 interaction inhibitor could be potentially used in cancer and cell therapy. This is suggested by the fact that the inhibitor decreased the levels of proteins which are important for stem cells' pluripotency. Remarkable reduction of OCT4

levels in EC cells presents this small molecular compound as a promising anticancer drug. To find out whether investigated inhibitor is suitable for clinical practice it must be studied how lower pAKT and OCT4 levels affect cancer stem cells' developmental potential and proliferative capacity in longer time scale.

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajaid Valmar Kasukit ja Toivo Maimetsa väärtuslike õpetussõnade, toetava koostöö ning pühendatud aja eest. Erilised tänusõnad Annika Treile, kes hoolitses igapäevaselt rakkude kasvatamise eest ning oli alati valmis aitama. Soovin tänada ka Dmitri Lubenetsi abi eest läbivoolutsütomeetriliste mõõtmiste läbiviimisel ja saadud tulemuste analüüsil. Tänusõnad ka Kristina Mäemets-Allasele inhibiitori ning sellega seotud nõuannete eest. Suured tänud kõikidele rakubioloogia õppetooli liikmetele meeldiva õhkkonna ning vastutulelikkuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., ja Hemmings, B. a (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15: 6541–6551.
- Alva, J., Lee, G.E., Escobar, E.E., ja Pyle, A.D. (2011). Phosphatase and Tensin Homolog Regulates the Pluripotent State and Lineage Fate Choice in Human Embryonic Stem Cells. *72*: 181–204.
- Andjelković, M., Maira, S.M., Cron, P., Parker, P.J., ja Hemmings, B. a (1999). Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and Ser473 kinase. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5061–5072.
- Andrews, P.W. (2002). From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357: 405–417.
- Andrews, P.W., Matin, M.M., Bahrami, a R., Damjanov, I., Gokhale, P., ja Draper, J.S. (2005). Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 1526–1530.
- Armstrong, L., Hughes, O., Yung, S., Hyslop, L., Stewart, R., Wappler, I., Peters, H., Walter, T., Stojkovic, P., Evans, J., *et al.* (2006). The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFκβ signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum. Mol. Genet.* 15: 1894–1913.
- Barry Pierce, G., Dixon, F., ja Verney, E. (1960). An Ovarian Teratocarcinoma as an Ascitic Tumor.
- Brozinick, J.T., ja Birnbaum, M.J. (1998). Insulin , but Not Contraction , Activates Akt / PKB in Isolated Rat Skeletal Muscle *. *Biochemistry* 14679–14682.
- Campbell, P.A., ja Rudnicki, M.A. (2013). Oct4 interaction with Hmgb2 regulates Akt signaling and pluripotency. *Stem Cells* 31: 1107–1120.
- Cheaib, B., Auguste, A., ja Leary, A. (2015). The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin. J. Cancer* 34: 4–16.
- Chen, K., Huang, Y., ja Chen, J. (2013). Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol. Sin.* 34: 732–740.
- Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., *et al.* (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes Dev.* 15: 2203–2208.
- Chen, Y.-G., Li, Z., ja Wang, X.-F. (2012). Where PI3K/Akt Meets Smads: the Crosstalk Determines Human Embryonic Stem Cell Fate. *Cell* 10: 231–232.
- Cheng, J.Q., Lindsley, C.W., Cheng, G.Z., Yang, H., ja Nicosia, S. V (2005a). The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* 24: 7482–7492.
- Cheng, J.Q., Lindsley, C.W., Cheng, G.Z., Yang, H., ja Nicosia, S. V (2005b). The Akt//PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* 24: 7482–7492.
- Clark, A.R., ja Toker, A. (2014). Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 42: 1349–1355.
- Cohen, A.A., Geva-Zatorsky, N., Eden, E., Frenkel-Morgenstern, M., Issaeva, I., Sigal, A., Milo, R., Cohen-Saidon, C., Liron, Y., Kam, Z., *et al.* (2008). Dynamic proteomics of individual cancer cells in response to a drug. *Science* 322: 1511–1516.
- Damjanov, I. (1993). Teratocarcinoma: Neoplastic lessons about normal embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 37: 39–46.
- Dean, M., Fojo, T., ja Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* 5: 275–284.

- Deng, C.-X. (2006). BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res.* 34: 1416–1426.
- Desai, N., Rambhia, P., ja Gishto, A. (2015). Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13: 5.
- Eiselleova, L., Matulka, K., Kriz, V., Kunova, M., Schmidtova, Z., Neradil, J., Tichy, B., Dvorakova, D., Pospisilova, S., Hampl, A., *et al.* (2009). A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27: 1847–1857.
- Ellwood-Yen, K., Keilhack, H., Kunii, K., Dolinski, B., Connor, Y., Hu, K., Nagashima, K., O'Hare, E., Erkul, Y., Di Bacco, A., *et al.* (2011). PDK1 Attenuation Fails to Prevent Tumor Formation in PTEN-Deficient Transgenic Mouse Models. *Cancer Res.* 71: 3052–3065.
- Fayard, E., Tintignac, L. a, Baudry, A., ja Hemmings, B. a (2005). Protein kinase B/Akt at a glance. *J. Cell Sci.* 118: 5675–5678.
- Flynn, P., Wong, M., Zavar, M., Dean, N.M., ja Stokoe, D. (2000). Inhibition of PDK-1 activity causes a reduction in cell proliferation and survival. *Curr. Biol.* 10: 1439–1442.
- Franke, T.F. (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27: 6473–6488.
- Furth, J., ja Kahn, M. (1937). The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Am. J. Cancer.*
- Gonzalez, E., ja McGraw, T.E. (2009a). The Akt kinases: isoform specificity in the metabolism and cancer. *Changes* 29: 997–1003.
- Gonzalez, E., ja McGraw, T.E. (2009b). Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 7004–7009.
- Gross, D.N., Wan, M., ja Birnbaum, M.J. (2009). The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Curr. Diab. Rep.* 9: 208–214.
- Hanahan, D., ja Weinberg, R. a. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.
- Hay, D.C., Sutherland, L., Clark, J., ja Burdon, T. (2004). Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 22: 225–235.
- Hirata, M., Kanematsu, T., Takeuchi, H., ja Yagisawa, H. (1998). Pleckstrin homology domain as an inositol compound binding module. *Jpn. J. Pharmacol.* 76: 255–263.
- Huang, J., ja Manning, B. (2010). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 37: 217–222.
- Hwang, H.C., ja Clurman, B.E. (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 24: 2776–2786.
- Jeong, C.H., Cho, Y.Y., Kim, M.O., Kim, S.H., Cho, E.J., Lee, S.Y., Jeon, Y.J., Lee, K.Y., Yao, K., Keum, Y.S., *et al.* (2010). Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28: 2141–2150.
- Josephson, R., Ording, C.J., Liu, Y., Shin, S., Lakshmipathy, U., Toumadje, A., Love, B., Chesnut, J.D., Andrews, P.W., Rao, M.S., *et al.* (2007). Qualification of embryonal carcinoma 2102Ep as a reference for human embryonic stem cell research. *Stem Cells* 25: 437–446.
- Kleinsmith, L., ja Barry Pierce, G. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. October.
- Kulik, G., Klippel, a, ja Weber, M.J. (1997). Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1595–1606.

- Lin, Y., Yang, Y., Li, W., Chen, Q., Li, J., Pan, X., Zhou, L., Liu, C., Chen, C., He, J., *et al.* (2012). Reciprocal Regulation of Akt and Oct4 Promotes the Self-Renewal and Survival of Embryonal Carcinoma Cells. *Mol. Cell* 48: 627–640.
- Maemets-Allas, K., Viil, J., ja Jaks, V. (2015). A novel inhibitor of AKT1-PDPK1 interaction efficiently suppresses the activity of AKT pathway and restricts tumor growth in vivo. *Mol. Cancer Ther.*
- Mallon, B.S., Park, K., Chen, K.G., Hamilton, R.S., ja Mckay, R.D.G. (2006). Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. 38: 1063–1075.
- Manning, B.D., ja Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261–1274.
- Matin, M.M., Walsh, J.R., Gokhale, P.J., Draper, J.S., Bahrami, A.R., Morton, I., Moore, H.D., ja Andrews, P.W. (2004). Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* 22: 659–668.
- Mbeunkui, F., ja Johann, D.J. (2009). Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63: 571–582.
- McLean, A.B., D'Amour, K. a, Jones, K.L., Krishnamoorthy, M., Kulik, M.J., Reynolds, D.M., Sheppard, A.M., Liu, H., Xu, Y., Baetge, E.E., *et al.* (2007). Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells* 25: 29–38.
- Medina, J.R. (2013). Selective 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) inhibitors: Dissecting the function and pharmacology of PDK1. *J. Med. Chem.* 56: 2726–2737.
- Meyer, M.J., Fleming, J.M., Ali, M. a, Pesesky, M.W., Ginsburg, E., ja Vonderhaar, B.K. (2009). Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44posCD24neg phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* 11: R82.
- Myers, M.P., Stolarov, J.P., Eng, C., Li, J., Wang, S.I., Wigler, M.H., Parsons, R., ja Tonks, N.K. (1997). P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 9052–9057.
- Niwa, H., Miyazaki, J., ja Smith, a G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24: 372–376.
- Raviv, Z. (2013). Leaders in Pharmaceutical Business Intelligence Funding , Deals & Partnerships : BIOLOGICS & Akt inhibition for cancer treatment , where do we stand today ?
- Reneer, M.C., ja Marti, F. (2012). The balancing act of AKT in T cells. *Front. Biol. (Beijing).* 8: 160–174.
- Romano, G. (2013). The Role of the Dysfunctional Akt-Related Pathway in Cancer: Establishment and Maintenance of a Malignant Cell Phenotype, Resistance to Therapy, and Future Strategies for Drug Development. *Scientifica (Cairo).* 2013: 317186.
- Scheid, M.P., Parsons, M., ja Woodgett, J.R. (2005). Phosphoinositide-dependent phosphorylation of PDK1 regulates nuclear translocation. *Mol. Cell. Biol.* 25: 2347–2363.
- Sharma, S. V, Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A., *et al.* (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141: 69–80.
- Silván, U., Díez-torre, A., Jiménez-rojo, L., ja Aréchaga, J. (2011). Embryonic and Cancer Stem Cells - two views of the same landscape. *Embryonic Stem Cells - Recent Adv. Pluripotent Stem Cell-Based Regen. Med.*
- Singh, A.M., Reynolds, D., Cliff, T., Ohtsuka, S., Mattheyses, A.L., Sun, Y., Menendez, L., Kulik, M., ja Dalton, S. (2012). Signaling network crosstalk in human pluripotent

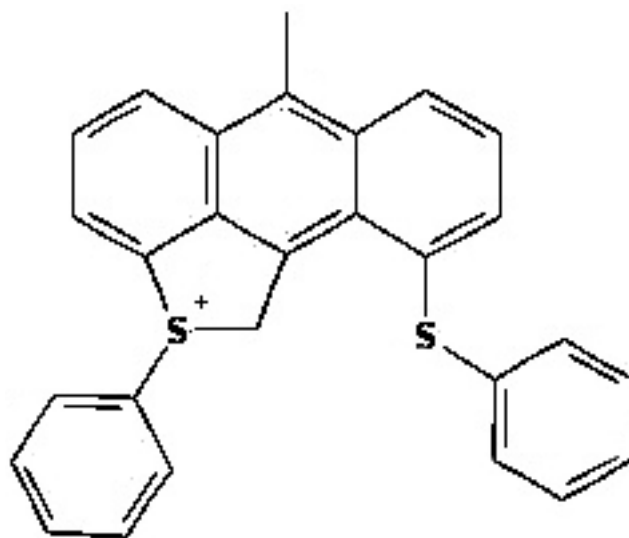
- cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 10: 312–326.
- Song, G., Ouyang, G., ja Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* 9: 59–71.
- Testa, J.R., ja Tschlis, P.N. (2005). AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene* 24: 7391–7393.
- Thomson, J. a, Itskovitz-eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M. a, Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., ja Jones, J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *1145: 1145–1147.*
- Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.-N., Smith, Z., Meissner, A., ja Ramanathan, S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* 145: 875–889.
- Toker, A., ja Marmiroli, S. (2012). Signaling Specificity in the Akt Pathway in Biology and Disease. *Changes* 29: 997–1003.
- Tsai, M.-J., Chang, W.-A., Huang, M.-S., ja Kuo, P.-L. (2014). Tumor Microenvironment: A New Treatment Target for Cancer. *ISRN Biochem.* 2014: 1–8.
- Vadlakonda, L., Dash, A., Pasupuleti, M., Anil Kumar, K., ja Reddanna, P. (2013). The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Front. Oncol.* 3: 165.
- Vazin, T., ja Freed, W.J. (2010). Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review. *28: 589–603.*
- Di Vizio, D., Cito, L., Boccia, A., Chieffi, P., Insabato, L., Pettinato, G., Motti, M.L., Schepis, F., D'Amico, W., Fabiani, F., *et al.* (2005). Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasias (ITGCN) to invasive germ cell tumors. *Oncogene* 24: 1882–1894.
- Watton, S., ja Downward, J. (1999). Akt / PKB localisation and 3 ' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell – matrix and cell – cell interaction Sandra J . Watton and Julian Downward. 1–2.
- Weeren, P.C. Van, Bruyn, K.M.T. De, Vries-smits, A.M.M. De, Lint, J. Van, ja Burgering, B.M.T. (1998). Essential Role for Protein Kinase B (PKB) in Insulin-induced Glycogen Synthase DOMINANT-NEGATIVE MUTANT OF PKB Essential Role for Protein Kinase B (PKB) in Insulin-induced Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation. *273: 1–8.*
- Xie, Z., Zeng, X., Waldman, T., ja Glazer, R.I. (2003). Transformation of Mammary Epithelial Cells by 3-Phosphoinositide- dependent Protein Kinase-1 Activates {beta}-Catenin and c-Myc, and Down-Regulates Caveolin-1. *Cancer Res.* 63: 5370–5375.
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Baudry, a, Dümmler, B., Hynx, D., ja Hemmings, B. a (2004). Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 350–354.
- Yuan, T.L., Wulf, G., Burga, L., ja Cantley, L.C. (2011). Cell-to-cell variability in PI3K protein level regulates PI3K-AKT pathway activity in cell populations. *Curr. Biol.* 21: 173–183.
- Zinda, M.J., Johnson, M.A., Paul, J.D., Horn, C., Konicek, B.W., Lu, Z.H., Sandusky, G., Thomas, J.E., Neubauer, B.L., Lai, M.T., *et al.* (2001). AKT-1, -2, and -3 are Expressed in Both Normal and Tumor Tissues of the Lung, Breast, Prostate, and Colon. *Clin. Cancer Res.* 7: 2475–2479.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

NCBI keemiliste ühendite andmebaas. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3246498> (07.04.16)

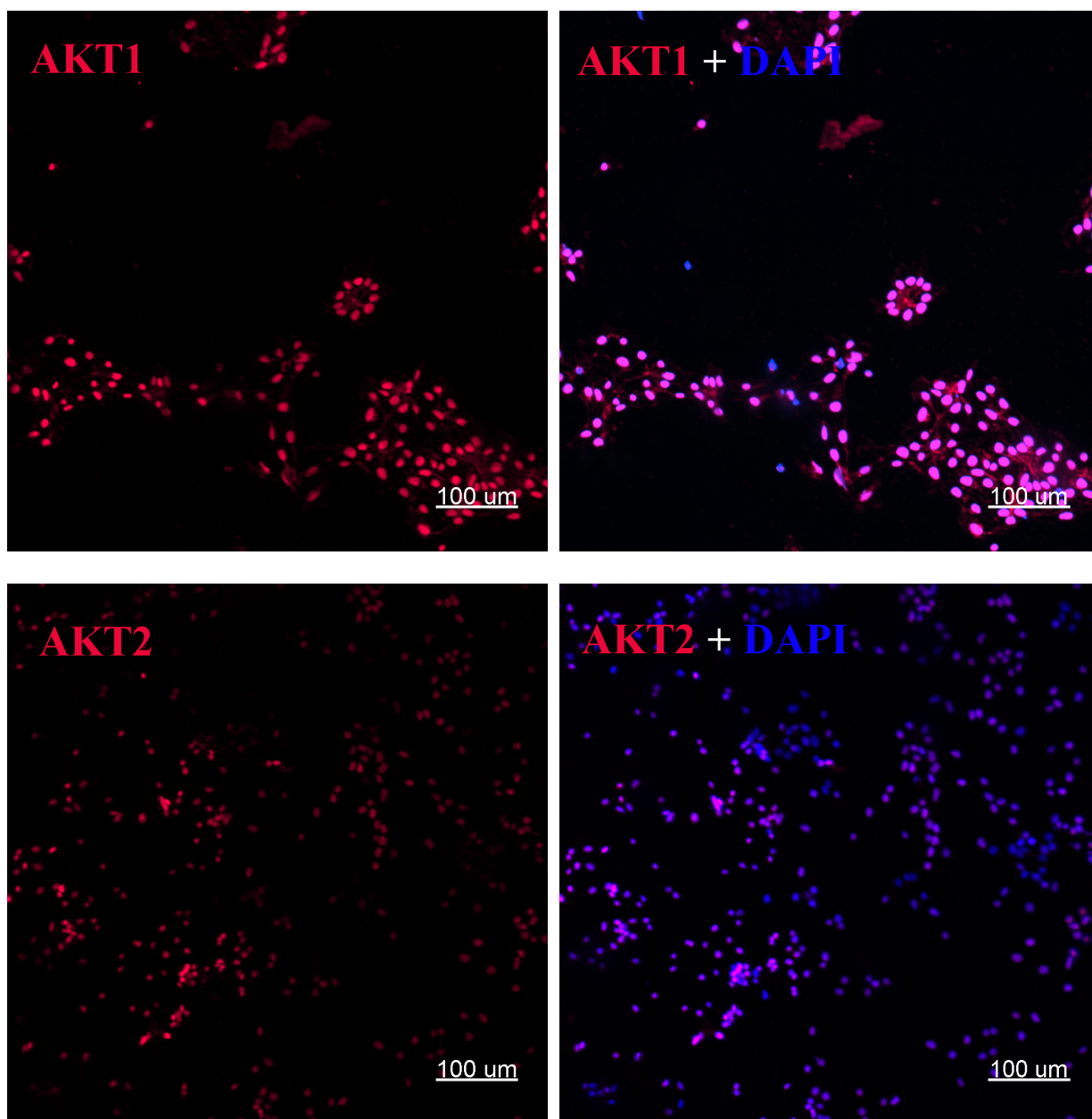
LISAD

Lisa 1

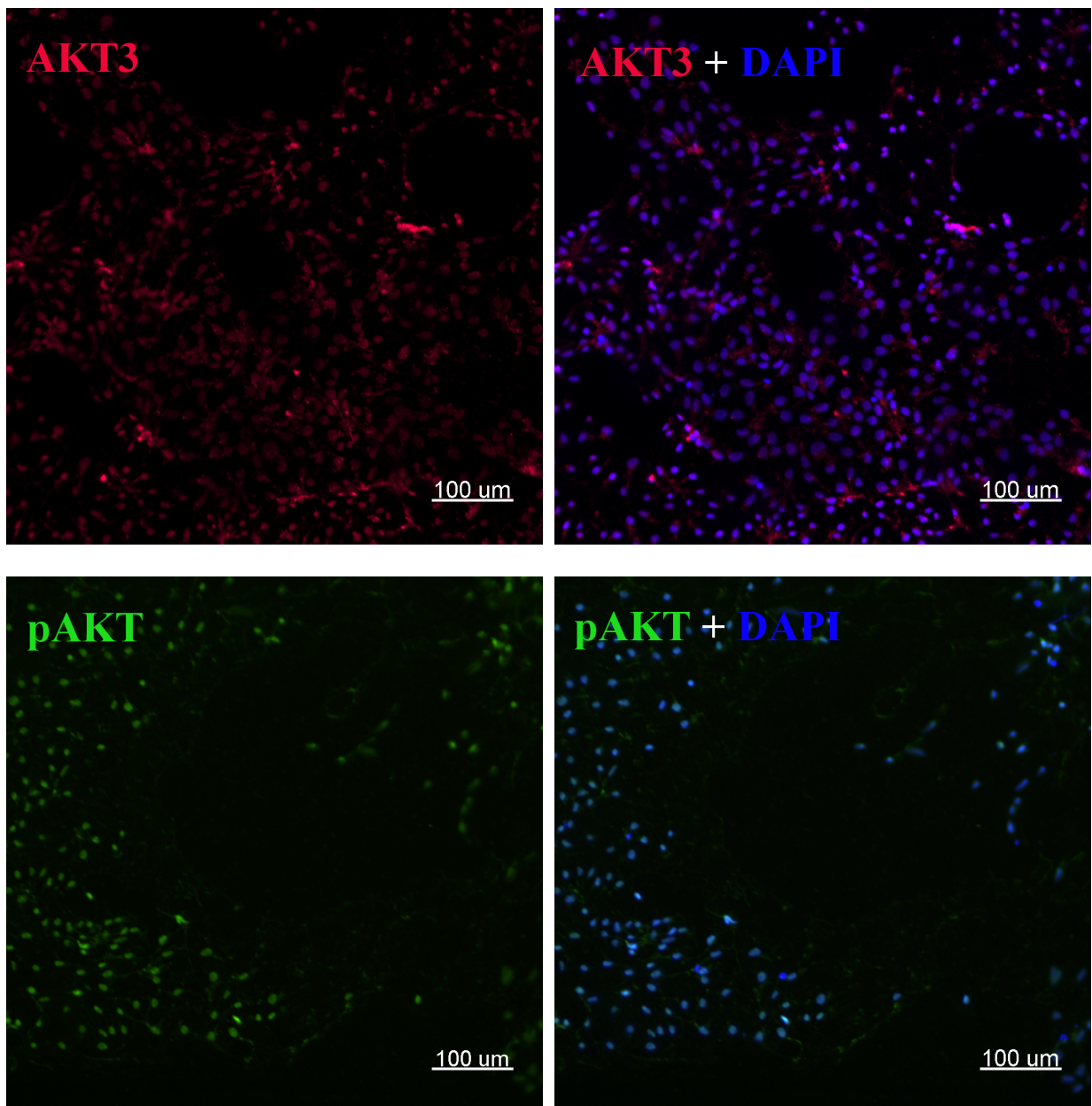


Joonis 1. Inhibiitori NSC156529 struktuur.

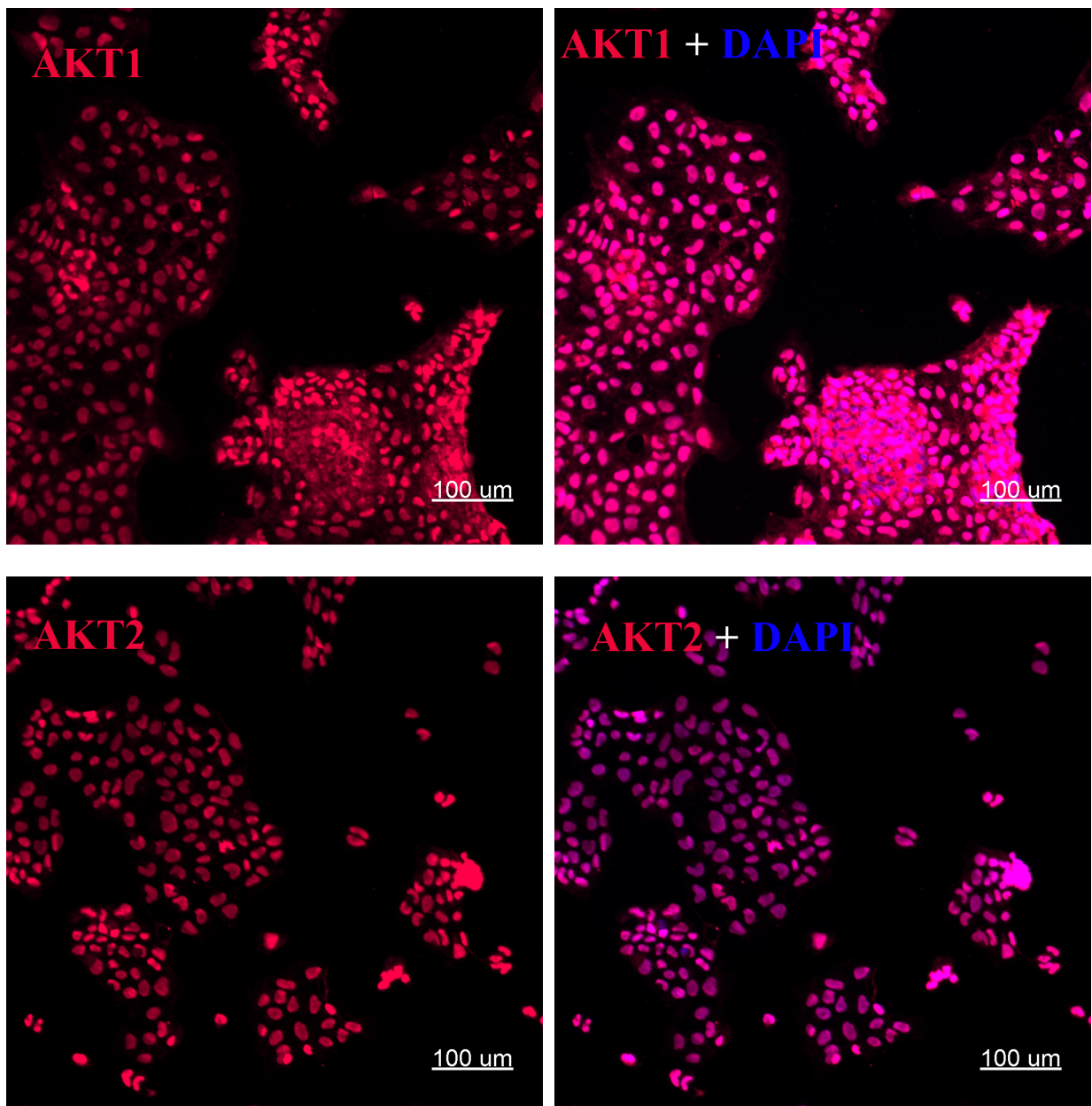
Lisa 2



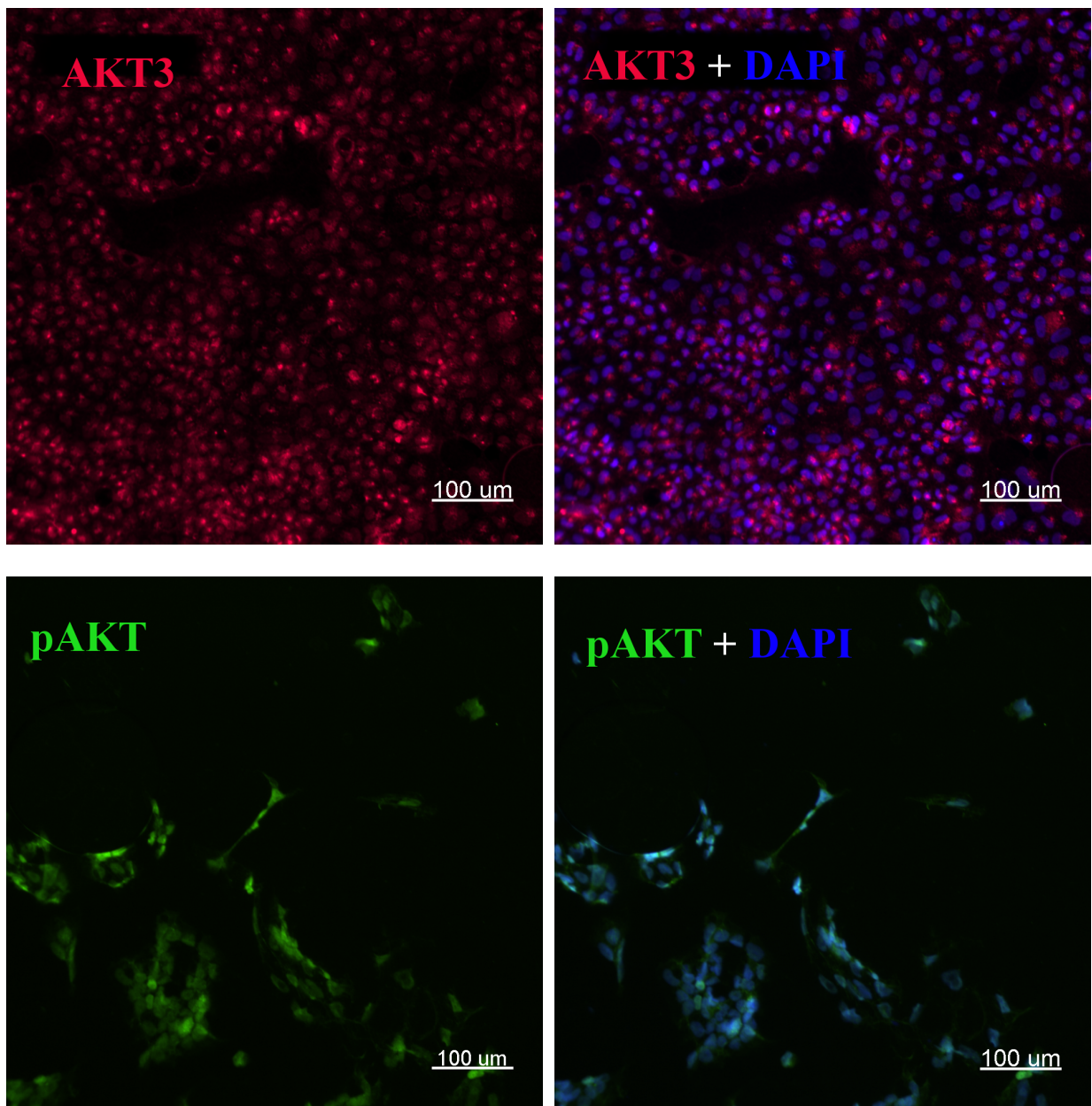
Joonis 1. AKT isovormide ekspressioon hES rakkudes. Vasakus tulbas on AKT isovormid näha punasena. Paremas tulbas on lisaks AKT isovormidele siniselt näha rakutuum (värvitud DNA-ga seonduva DAPI-ga). AKT isovormide esinemine tuumas on nähtav punase ja sinise kattumisel tekkiva lilla või roosa värvitoonina. Pildid on tehtud kasutades fluorentsismikroskoopi IX81 (Olympus Corporation, Jaapan).



Joonis 2. AKT isovormide ekspressioon hES rakkudes. Vasakus tulbas on AKT3 näha punasena ja pAKT rohelisena. Paremas tulbas on lisaks AKT isovormidele siniselt näha rakutuum (värvitud DNA-ga seonduva DAPI-ga). Pildid on tehtud kasutades fluorentsismikroskoopi IX81 (Olympus Corporation, Jaapan).

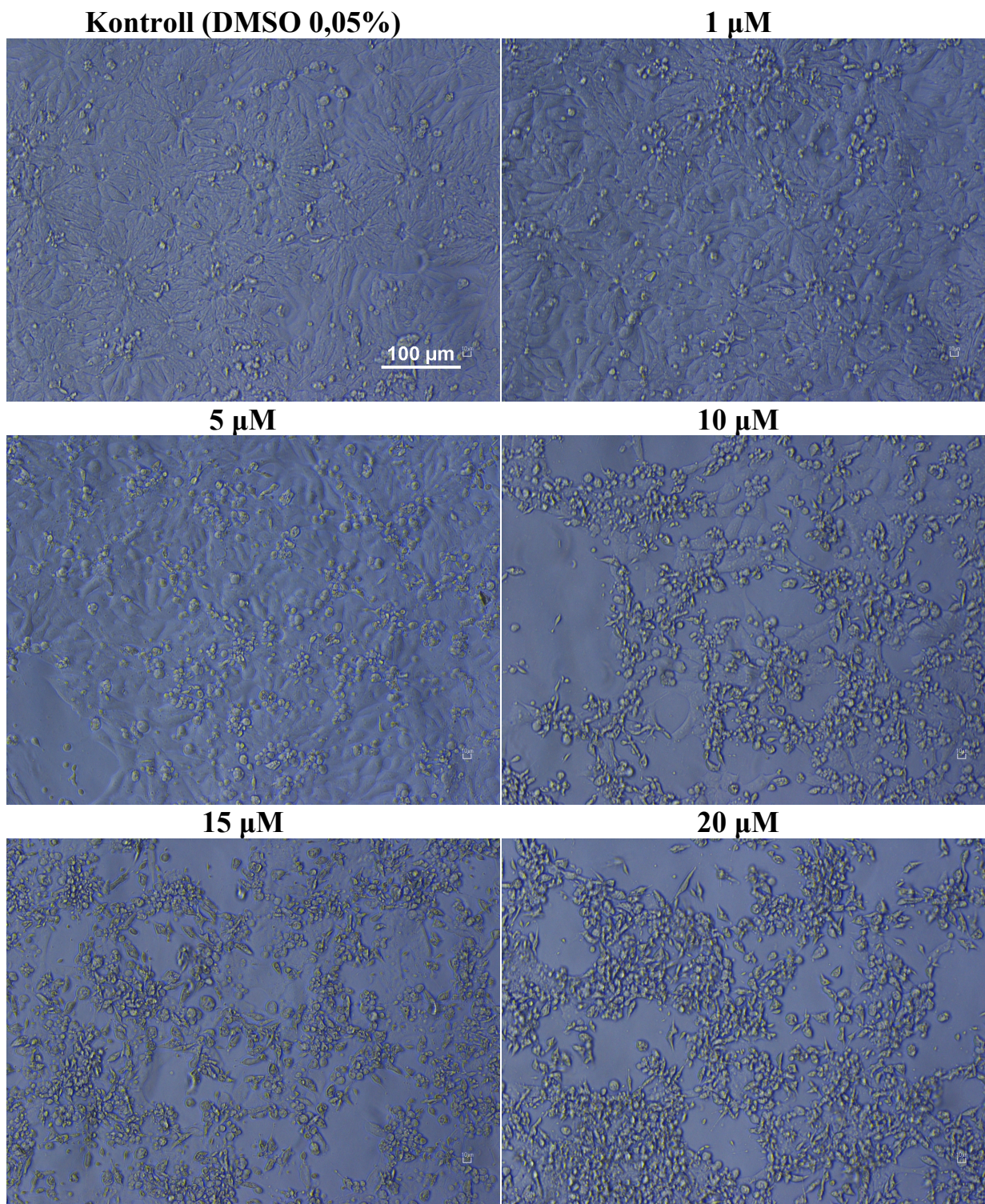


Joonis 3. AKT isovormide ekspressioon EC rakkudes. Vasakus tulbas on AKT isovormid näha punasena. Paremas tulbas on lisaks AKT isovormidele siniselt näha rakutuum (värvitud DNA-ga seonduva DAPI-ga). AKT isovormide esinemine tuumas on nähtav punase ja sinise kattumisel tekkiva lilla või roosa värvitoonina. Pildid on tehtud kasutades fluorentsismikroskoopi IX81 (Olympus Corporation, Jaapan).



Joonis 4. AKT isovormide ekspressioon EC rakkudes. Vasakus tulbas on AKT3 näha punasena ja pAKT rohelisena. Paremas tulbas on lisaks AKT isovormidele siniselt näha rakutuum (värvitud DNA-ga seonduva DAPI-ga). Pildid on tehtud kasutades fluoresentsmikroskoopi IX81 (Olympus Corporation, Jaapan).

Lisa 3



Joonis 1. Inhibiitori (1–20 μM) mõju hES rakkude morfoloogiale. 4-tunnise inkubeerimise tulemusel ilmneb tsütotoksiline efekt märkimisväärselt 10 μM inhibiitori kontsentratsioonil, mistõttu kasutati käesolevas töös inhibiitori kontsentratsioone kuni 5 μM .

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks:

Mina, Egle-Helene Ervin (sünnikuupäev: 26.10.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „PDPK1-AKT1 vahelise interaktsiooni inhibiitori mõju inimese embrüonaalsetele tüvirakkudele ja embrüonaalse kartsinoomi rakkudele“, mille juhendajateks on Valmar Kasuk ja Toivo Maimets
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 24.05.2018 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016